

**Pangliale Gap Junction - gekoppelte Netzwerke im  
Thalamus der Maus und deren Beeinflussung durch  
Barreloidgrenzen und neuronale Aktivität**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Lena Maria Claus**

aus Siegburg

2017

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Steinhäuser
2. Gutachter: Prof. Dr. Valentin Stein

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.07.2017

Aus dem Institut für Zelluläre Neurowissenschaften  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Christian Steinhäuser

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Deutsche Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Abkürzungsverzeichnis .....	6
1.2 Einleitung .....	7
1.3 Material und Methoden .....	8
1.4 Ergebnisse .....	13
1.5 Diskussion.....	18
1.6 Zusammenfassung.....	21
1.7 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung .....	23
<b>2. Publikation.....</b>	<b>27</b>
Abstract.....	28
Introduction .....	28
Materials and Methods.....	29
Results .....	32
Discussion.....	34
References.....	36
<b>3. Danksagung.....</b>	<b>38</b>

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Abkürzungsverzeichnis

ACSF artificial cerebrospinal fluid, künstlicher Liquor cerebrospinalis

Biocytin N-Biotinyl-L-Lysin

Cx Connexin

EGFP enhanced green fluorescent protein, verstärkt grün fluoreszierendes Protein

GFP green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein

GJ Gap Junction

hGFAP human glial fibrillary acid protein, humanes saures Gliafaserprotein

PBS phosphatgepufferte Salzlösung

PFA Paraformaldehyd

pH pH-Wert

PLP Myelin Proteolipid Protein

RT Raumtemperatur

SR101 Sulforhodamin 101

TRD Texas Red Dextran

TTX Tetrodotoxin

VPM Nucleus ventralis posteromedialis

ZNS zentrales Nervensystem

2-NBDG Glukoseanalogon

3D dreidimensional

## 1.2 Einleitung

Das Nervensystem ist ein komplexes Organ, das verschiedene wichtige Funktionen erfüllt. Gehirn und Rückenmark bilden das zentrale Nervensystem (ZNS). Dieses ist über periphere Nerven mit verschiedenen Effektororganen verbunden. Zu den Hauptaufgaben des Nervensystems gehören das Denken, die Verarbeitung von Reizen und die Auslösung von Reaktionen und willkürlichen Bewegungen. Es ermöglicht dem Menschen seine Umwelt wahrzunehmen und auf sie zu reagieren. Neben den Nervenzellen (Neuronen) gibt es eine Reihe weiterer Zelltypen (Gliazellen), die für die vielfältigen Funktionen unerlässlich sind.

Das Gehirn besteht aus vielen verschiedenen Bereichen, die jeweils unterschiedliche Aufgaben haben. Der Thalamus ist ein wichtiger Teil des Zwischenhirns und hat mehrere Kerngebiete. Der dorsale Anteil stellt die Verbindung zwischen Umwelt und Bewusstsein her, indem er die eingehenden Informationen zum Großhirn weitergibt und moduliert. Der Nucleus ventralis posteromedialis (VPM) spielt eine wichtige Rolle in dem somatosensorischen System. Sensorische Signale werden von der Peripherie aus somatotop geordnet weitergegeben und über verschiedene Stationen zur Großhirnrinde geleitet. Bei Mäusen ist diese somatotope Gliederung besonders gut sichtbar. Der VPM enthält dort ein Feld von keulenförmigen Zellansammlungen, sogenannte Barreloids (Land et al., 1995; Van der Loos, 1976). Jedes Barreloid erhält Informationen von einem bestimmten Tasthaar der Maus und leitet diese an einen bestimmten Barrel im Kortex weiter (Haidarliu and Ahissar, 2001; Mosconi et al., 2010; Sugitani et al., 1990). Ein Barreloid besteht aus gruppiert liegenden Neuronen, die an der Verschaltung des somatotop gegliederten Signalweges beteiligt sind. Zwischen zwei benachbarten Barreloids liegt eine zeldichte Grenze.

Neben den Neuronen spielen die Gliazellen im Gehirn eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren hat sich unser Wissen über die Funktion dieser Zellen fundamental verändert. Gliazellen besitzen praktisch das gleiche Repertoire an Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren wie Neuronen. Wir wissen jetzt, dass sie damit aktiv die Informationsverarbeitung beeinflussen. Insbesondere Astrozyten haben eine Reihe wichtiger Aufgaben, wie Ionenhomöostase ( $K^+$ -Pufferung), Nährstofftransport, Neurotransmitteraufnahme aus dem synaptischen Spalt (Glutamat,  $\gamma$ -Aminobuttersäure) und aktivitätsabhängige Gliotransmitterfreisetzung (Glutamat, Adenosintriphosphat, D-

Serin) (Giaume et al., 2010; Haydon and Carmignoto, 2006; Henneberger et al., 2010; Volterra and Steinhäuser, 2004). Sie bilden über Gap Junction (GJ)-Kanäle, die aus den Connexinen (Cx) 26, 30 und 43 aufgebaut sind, funktionelle Netzwerke. Durch diese Kanäle ist der Austausch von Ionen und Signalmolekülen innerhalb des Netzwerkes möglich (Giaume et al., 2010; Nagy et al., 2011). Diese interzelluläre Kommunikation tritt in allen Hirnregionen auf, und es wurde eine Ausrichtung der glialen Netzwerke entlang kompartimentierter funktioneller neuronaler Einheiten beobachtet (z.B. Barrels im somatosensorischen Kortex, olfaktorische Glomeruli) (Houades et al., 2008; Roux et al., 2011).

Obwohl der Thalamus als sensorische Eingangsstruktur zum Kortex eine enorme Bedeutung für die Hirnfunktion hat, sind die Eigenschaften von Astrozyten dieser Hirnregion weitgehend unbekannt. Bisher gibt es keine Arbeit, die die funktionellen Eigenschaften von Gliazellen und ihren Einfluss auf neuronale Signalwege in den Barreloids untersucht hat. Auch in dem englischsprachigen Standardwerk „The Thalamus“ (Jones, 2007) werden Begriffe wie Gliazelle, Astrozyt oder Oligodendrozyt im Index nicht erwähnt.

Ziel meiner Arbeit war deshalb die Charakterisierung von glialen Netzwerken im VPM der Maus. Die Hauptfrage war, ob die Netzwerke in ihrer Ausbildung von den Barreloidstrukturen beeinflusst werden. Außerdem ist sehr wenig über den genauen Aufbau der Barreloids selbst bekannt. Uns interessierte besonders, welche Zellen die zeldichten Grenzen bilden und wie die verschiedenen Zelltypen innerhalb der Barreloids verteilt sind. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe an adulten Mäusen haben gezeigt, dass sich die glialen Netzwerke stark von denen in anderen Hirnregionen unterscheiden. Besonders häufig findet man hier eine Kopplung zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten, die sogenannte pangliale Kopplung (Griemsmann et al., 2015). Oligodendrozyten sind Gliazellen, die mit ihren Fortsätzen die Myelinscheide um Axone bilden. Diese panglialen Netzwerke wollten wir auch in jungen Mäusen quantifizieren und in Bezug zu den Barreloids untersuchen.

### **1.3 Material und Methoden**

Die Experimente wurden an Gewebe von verschiedenen Mauslinien im Alter von 14 bis 17 Tagen durchgeführt. Neben Wildtyp-Mäusen wurden verschiedene transgene



Mauslinien mit Astrozyten- (human glial fibrillary acidid protein-enhanced green fluorescence protein (hGFAP-EGFP), Nolte et al. 2001) und Oligodendrozyten-spezifischer (myelin proteolipid protein-green fluorensence protein (PLP-GFP), Fuss et al. 2000) Fluoreszenzmarkierung verwendet. In den transgenen Mäusen wurde das GFP jeweils promotorspezifisch exprimiert, sodass man die Astrozyten (hGFAP-EGFP-Maus) bzw. Oligodendrozyten (PLP-GFP-Maus) leicht an ihrer grünen Fluoreszenz erkennen konnte. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen gehalten und die durchgeführten Experimente erfüllten alle lokalen, deutschen und europäischen Vorschriften.

### *Schnitte*

Um die glialen Netzwerke innerhalb der Barreloids untersuchen zu können, musste zunächst eine geeignete Schnitttechnik gefunden werden. In den sonst üblichen Standardschnitten (z.B. horizontal, frontal) sind die kleinen Barreloids nicht erkennbar. Deshalb wurden Kunststoffblöcke mit Winkeln zwischen 5° und 40° hergestellt und verschiedene Schnittebenen an Gehirnen von Wildtyp-Mäusen getestet. Nachdem ich die beste Schnittebene durch den VPM gefunden hatte, wollte ich sicher sein, dass die sichtbaren Strukturen auch wirklich die gesuchten Barreloids waren. Deshalb benutzte ich die Cytochromoxidase-Färbung, die Barreloids und auch die Barrels im Kortex anfärbt. Dafür wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und die Gehirne heraus präpariert. Diese wurden dann als Ganzes in Paraformaldehyd (PFA) fixiert und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelagert. Dann wurden 40 µm dicke Schnitte in der speziellen Schnitttechnik (siehe Ergebnisse) mithilfe der Blöcke und eines Vibratoms hergestellt und in dem Färbemedium inkubiert.

### *Elektrophysiologie*

Für die Netzwerkanalyse benutzte ich die Patch-Clamp-Technik. Dafür wurden akute Hirnschnitte gefertigt, in denen man unter dem Mikroskop mithilfe einer Pipette einen Zugang zu einer noch lebenden Zelle schaffte. Durch eine Elektrode in der Pipette und einer Elektrode in der Badlösung konnte ich Ströme durch die Zellmembran messen und außerdem die Zelle mit verschiedenen Molekülen füllen. Für die Schnittherstellung wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt und das Gehirn schnell herauspräpariert. Mithilfe eines Vibratoms, das mit carbogenbegaster eiskalter Präparationslösung gefüllt war, wurde es dann in 200 µm dicke Schnitte geschnitten. Danach kamen die Schnitte

zunächst in der gleichen Lösung für 20 min in ein Wasserbad bei 35 °C und wurden dann in carbogenisiertem künstlichen Liquor cerebrospinalis (ACSF) bei Raumtemperatur (RT) gelagert (pH 7.4). Für die Experimente wurde dann jeweils ein Schnitt in die Messkammer eines Mikroskops gelegt, die kontinuierlich mit carbogenisiertem ACSF gespült wurde. Durch die besondere Schnitttechnik waren die Barreloidgrenzen mithilfe einer CCD Kamera ohne Anfärbung sichtbar. Die Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren mit 2 mm äußerem Durchmesser hergestellt und mit einer Innenlösung, die N-biotinyl-l-lysine (Biocytin) und Texas Red Dextran (TRD) enthielt, gefüllt. Damit hatten sie einen Widerstand von 3-5 MΩ. Das Molekül Biocytin ist 372 Da groß und kann die GJ zwischen gekoppelten Gliazellen passieren. Es breitet sich während der Füllungs- und Messzeit in dem Netzwerk der gefüllten Zelle aus. TRD ist mit 3 kDa viel größer und verbleibt in der initial gefüllten Zelle. So war es möglich, in der späteren Auswertung die gefüllte Zelle und die gekoppelten Zellen zu identifizieren. Pro Schnitt habe ich einen Astrozyt ausgewählt und für 20 min mit der Innenlösung im Voltage-Clamp-Modus gefüllt. Das Haltepotential war -80 mV und die Ströme wurden alle 10 min gemessen. Nach der Füllung wurden die Schnitte über Nacht in 4% PFA fixiert und in PBS gelagert.

In den Schnitten der hGFAP-EGFP Mäuse wurden die Astrozyten durch ihre starke grüne Fluoreszenz, die elektrophysiologischen Eigenschaften und die typische Morphologie identifiziert (Matthias et al., 2003). Für die Experimente zur panglialen Kopplung wurden PLP-GFP-Mäuse ohne Astrozytenmarkierung benutzt. Diese Schnitte wurden deshalb mit ACSF und Sulforhodamin 101 (SR101) präinkubiert (Griemsmann et al., 2015), um die Astrozyten anzufärben. Für die Glukose-Experimente wurde zu der Innenlösung neben Biocytin und TRD das Glukoseanalogon 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglukose (2-NBDG) hinzugefügt. Um den Einfluss neuronaler Aktivität auf die glialen Netzwerke zu untersuchen, wurden die Schnitte vor den Experimenten (für 3-4 h) und währenddessen mit Tetrodotoxin (TTX) und ω-Conotoxin GVIA inkubiert. Diese Toxine hemmen die neuronale Aktivität.

#### *Visualisierung der gefüllten Netzwerke*

Um die Netzwerke nach dem Füllen sichtbar zu machen, wurde das Biocytin in den fixierten Schnitten angefärbt. Dazu wurden die Schnitte mit Streptavidin-Cy5 oder Streptavidin-Alexa Fluor 647 inkubiert. In Schnitten von PLP-GFP Mäusen wurde

zusätzlich das GFP mit Huhn anti-GFP und Ziege anti-Huhn Alexa Fluor 488 nachgefärbt. Außerdem wurde an allen Schnitten eine Kernfärbung mit Hoechst durchgeführt, um die Barreloidgrenzen besser darzustellen.

#### *Einzelzellektroporation*

Um die Lage und Ausrichtung von Neuronen innerhalb der Barreloids zu untersuchen, wurden 8-12 Neurone pro Schnitt mittels Einzelzellektroporation (Nevian and Helmchen, 2007) mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 594 gefüllt. Dafür wurden die Schnitte an einem TCS SP5 Mikroskop mit ACSF bei RT perfundiert und die Zellen mithilfe eines Spannungspulses, der eine transiente Pore in der Plasmamembran bildete, mit dem Farbstoff gefüllt. Für die Auswertung wurden Bildstapel aufgenommen, dreidimensionale (3D) Rekonstruktionen zu Isooberflächen verrechnet und als Ellipsoide dargestellt. Dann wurde pro Schnitt der Winkel zwischen den Summenwinkeln der Ellipsoide und der Barreloidachse berechnet.

#### *Immunhistochemie*

Um die Verteilung der verschiedenen Zelltypen innerhalb der Barreloids zu untersuchen, führte ich verschiedene Färbungen durch. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin und Medetomidine Hydrochlorid anästhesiert und mit PBS und PFA perfundiert, um das Blut zu entfernen. Dann wurden die Gehirne herauspräpariert und zum Schutz vor Gefrierartefakten für 2-3 Tage in 30 % Sucrose in PBS gelagert. Danach wurden sie gefroren und mithilfe eines Vibratoms geschnitten (80  $\mu\text{m}$ ). Die Schnitte wurden zunächst mit dem Primär-Antikörper (Huhn anti-GFP, Maus anti-SMI312 und Maus anti-NeuN) und dann mit dem passenden Sekundär-Antikörper (Ziege anti-Maus Alexa Fluor 594, Ziege anti-Hase Alexa Fluor 594, Ziege anti-Huhn Alexa Fluor 488 und Ziege anti-Maus Alexa Fluor 647) inkubiert. Außerdem wurden alle Schnitte mit der Kernfärbung Hoechst gefärbt um die Barreloidgrenzen besser sichtbar zu machen.

#### *Datenanalyse*

Von den Netzwerken wurden x/y/z-Schichtbilder aufgenommen. Zwei verschiedene Herangehensweisen wurden für die Kopplungsanalyse benutzt. Um die Netzwerkgröße und Netzwerkform in hGFAP-EGFP-Mäusen zu untersuchen, wurde die z-Ebene ausgewertet, die die initial gefüllte Zelle (TRD) beinhaltet. Dann wurden die Biocytin-positiven Zellen nur in dieser Ebene gezählt. Die räumliche Ausdehnung parallel und

orthogonal zu den Barrelidgrenzen wurde mithilfe von zwei Fluoreszenz-Linienprofilen durch das Netzwerk bestimmt (Abbildung 1). Das Verhältnis der parallelen zur orthogonalen Länge ( $y/x$ ) wurde als Maß für die Form der Netzwerke benutzt. Die Distanz der gepatchten Zelle vom kalkulierten Netzwerkzentrum wurde als Indikator für eine Grenz Wirkung für die Farbstoff-Diffusion benutzt (Anders et al., 2014). Diese wurde anhand des Fluoreszenzprofils orthogonal zu den Barrelidgrenzen ( $x$ ) bestimmt.

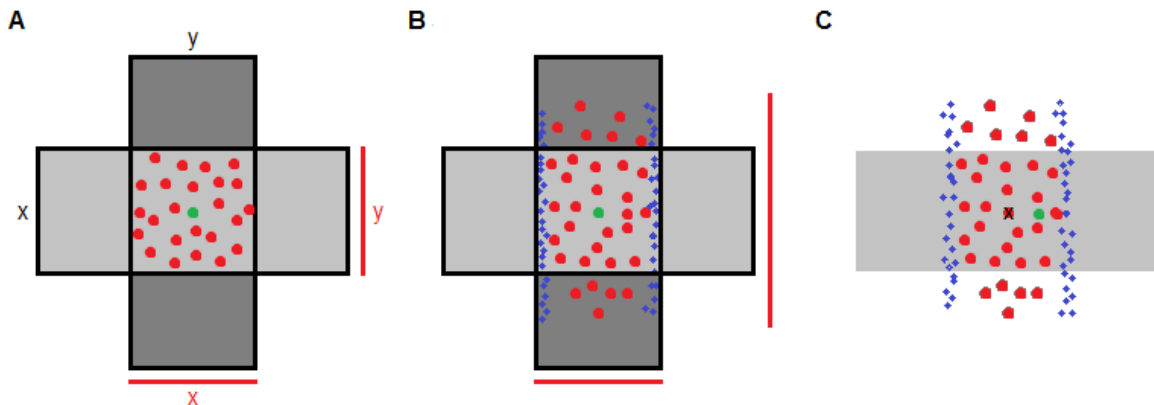


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Netzwerkanalyse.

Für die Netzwerkanalyse benutzte ich die Patch-Clamp-Technik. Dabei wurde jeweils ein Astrozyt mithilfe einer Pipette mit Biocytin und TRD gefüllt. Das kleine Molekül Biocytin diffundiert dann über Kanäle zwischen den gekoppelten Zellen in das Netzwerk, während das große Molekül TRD in der gepatchten Zelle blieb. Neben Netzwerken in den Barreloids wurden auch Netzwerke außerhalb der Barreloids als Vergleich gefüllt. Für die Auswertung wurde danach noch eine Kernfärbung mit Hoechst durchgeführt, um die zellreichen Grenzen darzustellen.

In A bis C stellt der grüne Punkt den gepatchten Astrozyten dar. Die roten Punkte stellen die weiteren Zellen des Biocytin-gefüllten Netzwerkes dar. A zeigt ein Netzwerk außerhalb der Barreloids. B und C zeigen Netzwerke innerhalb eines Barreloids. Die blauen Punkte stellen die zellreichen Barrelidgrenzen dar.

Für die Auswertung der Netzwerkform (A, B) wurden zwei Linienprofile ( $x$ : hellgrau, senkrecht zu den Barrelidgrenzen;  $y$ : dunkelgrau, parallel zu den Barrelidgrenzen) durch das Netzwerk erstellt. Die roten Linien zeigen jeweils, auf welcher Strecke des Linienprofils das Netzwerk durch seine Fluoreszenz messbar wurde. A: Das Netzwerk außerhalb der Barreloids ist rund, die Linienprofile (rote Linien) sind deshalb gleich lang und somit das Verhältnis  $y/x=1$ . B: Das Netzwerk innerhalb eines Barreloids ist länglich, das Linienprofil  $y$  deshalb länger und somit das Verhältnis  $y/x > 1$ . C: Um den Grenzeffekt der Barrelidgrenzen genauer zu untersuchen, wurden Astrozyten nahe der Barrelidgrenzen gefüllt. Dann wurde der Abstand zwischen Netzwerkzentrum (Kreuz) und der gefüllten Zelle (grün) mithilfe eines Linienprofils (hellgrau) gemessen.

Für die Quantifizierung der panglialen Kopplung in PLP-Mäusen wurden hingegen die Biocytin-gefüllten Zellen aller z-Ebenen der Netzwerke gezählt. Dieses 3D-Zählen wurde

auch für die Experimente zum Einfluss neuronaler Aktivität und die Glukose-Experimente benutzt.

Um die Orientierung neuronaler Fortsätze in Bezug zu den Barreloids zu untersuchen, wurden Schichtaufnahmen von mehreren mit Farbstoff gefüllten Neuronen gemacht. Dann wurden 3D-Rekonstruktionen der Neurone angefertigt und Isooberflächen berechnet, deren Volumen jeweils als Ellipsoid dargestellt wurde. Danach wurde ein Summenvektor für die Ellipsoide bestimmt, um die Ausrichtung der neuronalen Strukturen zu beschreiben. Die beiden Grenzen des Barreloids, in dem die Neurone lagen, wurden ebenfalls als Vektoren betrachtet und zu einem Summenvektor gemittelt. Der Winkel zwischen den Barreloidgrenzen und der neuronalen Orientierung wurde für jeden Hirnschnitt bestimmt.

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes und  $n$  bezeichnet die Nummer der untersuchten Mäuse. Die Anzahl der untersuchten Schnitte ist in den Ergebnissen angegeben.

Die Daten wurden statistisch ausgewertet. Bei abhängigen Stichproben wurde ein Student's t-Test und bei multiplen Paarvergleichen eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt. Unterschiede wurden bei einem  $P < 0,05$  (\*) oder  $P < 0,01$  (\*\*) als signifikant betrachtet.

## **1.4 Ergebnisse**

Mein erstes Ziel war die Darstellung der Barreloids in akuten Hirnschnitten. Um die kleinen Strukturen für die Kopplungsanalyse darzustellen, habe ich verschiedene Schnittebenen durch den VPM getestet. Ich entwickelte eine spezielle neue Schnitttechnik, bei der die Barreloids ohne Anfärbung gut sichtbar wurden. Die Schnittebene wurde mithilfe von Plastikblöcken und vorherigem Zuschneiden (Abbildung 2)  $30^\circ$  lateral und  $5^\circ$  anterior von der Horizontalen angehoben. Eine Cytochromoxidase-Färbung bestätigte, dass es sich bei den dargestellten Strukturen um die gesuchten Barreloids handelte (Mosconi et al., 2010). Da die Barreloidgrenzen in den akuten Hirnschnitten gut, nach der Fixierung aber kaum zu erkennen waren, suchte ich nach einer Färbung, um sie anhaltend für Abbildungen zu visualisieren. Eine Kernfärbung mit Hoechst war eine einfache Möglichkeit, die zellreichen Grenzen gleichzeitig mit dem Netzwerk darzustellen.

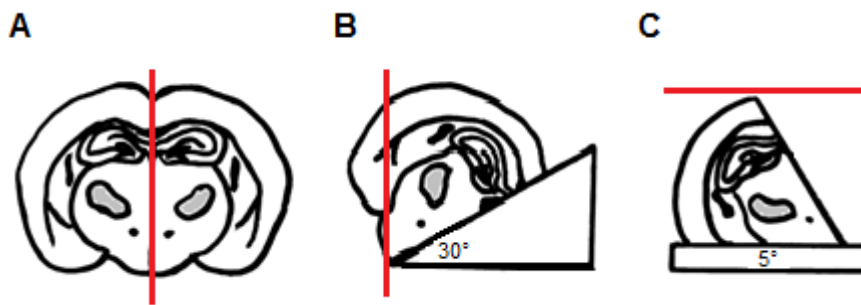


Abbildung 2: Schema der neuen Schnitttechnik.

Dargestellt ist ein Maushirn mit den Strukturen, die in einem frontalen Hirnschnitt sichtbar wären. Die grauen Bereiche stellen die somatosensorischen Thalamuskern dar, in denen die Barreloids liegen. Die roten Linien stellen die Schnittlinien dar. A: Zuerst wurde das Gehirn median durchtrennt und so in die beiden Hemisphären unterteilt. B: Jede Hemisphäre wurde mit der Schnittfläche so wie abgebildet auf einen Winkelblock mit  $30^\circ$  gelegt. Dann wurde der untere Teil senkrecht am Blockrand abgetrennt und verworfen. C: Die Gehirnhälften wurden mit der letzten Schnittfläche und dem vorderen Gehirnpol unten auf einen  $5^\circ$  Winkelblock aufgeklebt und von oben nach unten geschnitten.

Nach der Schnittoptimierung konnte ich mit den Kopplungsexperimenten beginnen, um die glialen Netzwerke bezüglich ihrer Größe und Form zu untersuchen. Um festzustellen, ob die Barreloids einen Einfluss auf die Ausbildung der Netzwerke haben, wurden vergleichende Experimente in Barreloids und außerhalb des Barreloidfeldes durchgeführt. Dafür wurden im VPM juveniler hGFAP-EGFP-Mäuse einzelne Astrozyten und deren Netzwerke für 20 min mit Biocytin gefüllt. Die Barreloids waren ungefähr 50 bis 120  $\mu\text{m}$  breit und 700  $\mu\text{m}$  lang. Die Anzahl der gekoppelten Zellen in der Ebene der gepatchten Zelle war in Netzwerken innerhalb der Barreloids ( $25,8 \pm 1,7$  Zellen; 19 Schnitte von 13 Mäusen) und außerhalb ( $37 \pm 5,9$  Zellen; 19 Schnitte von 12 Mäusen) gleich. Die Netzwerke hatten aber eine unterschiedliche Form. Innerhalb der Barreloids wirkten sie oval, außerhalb rund. Um diesen Eindruck zu objektivieren habe ich Fluoreszenz-Linienprofile der Netzwerke erstellt und die Form der Netzwerke systematisch analysiert. Die Breite der halbmaximalen Intensität in den parallel und orthogonal zu den Grenzen liegenden Profilen wurde bestimmt und das Verhältnis ( $y/x$ ) gebildet. Dieses Verhältnis ist definitionsgemäß bei runden Flächen 1 und bei gestreckten Flächen  $>1$ . Wie schon vermutet, zeigten Netzwerke in Barreloids ein Verhältnis  $>1$  ( $1,53 \pm 0,08$ ; 19 Schnitte von 13 Mäusen). Die Netzwerke außerhalb des Barreloidfeldes hingegen zeigten ein signifikant kleineres Verhältnis nahe 1 ( $0,95 \pm 0,04$ ,

19 Schnitte von 12 Mäusen). Demnach ist in den Barreloids die Diffusion von Biocytin zwischen gekoppelten Zellen anisotrop und vorzugsweise entlang deren Längsachse ausgebildet. Um den vermuteten Grenzeffekt der Barreloidgrenzen noch besser darzustellen habe ich Astrozyten nahe einer Grenze gefüllt. Wie erwartet, zeigte sich eine asymmetrische Biocytindiffusion von der Grenze weg. Für die Auswertung habe ich den orthogonal zu den Barreloidgrenzen verlaufenden Abstand der gepatchten Zelle von der Netzwerkmitte berechnet. Es zeigte sich, dass dieser Abstand signifikant größer war ( $13,7 \pm 2,3 \mu\text{m}$  Abstand, 11 Schnitte von 9 Mäusen) als bei den vorherigen Experimenten (gepatchte Zelle außerhalb der Barreloids:  $7,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$  Abstand, 19 Schnitte von 12 Mäusen; gepatchte Zelle mittig in Barreloid:  $6,2 \pm 1,3 \mu\text{m}$  Abstand, 8 Schnitte von 6 Mäusen). Zusammen zeigen diese Daten, dass die Barreloidgrenzen eine Barriere für die glialen Netzwerke bilden und damit die gliale Kommunikation auf ein einzelnes Barreloid begrenzen.

Das nächste Ziel war die Untersuchung der glialen Netzwerke bezüglich ihrer Zellzusammensetzung. Unsere Arbeitsgruppe hat im Vorfeld gezeigt, dass gliale Netzwerke im Thalamus adulter Mäuse aus Astrozyten und Oligodendrozyten bestehen (Griemsmann et al., 2015). Um zu untersuchen, ob auch im juvenilen Thalamus Oligodendrozyten an den Netzwerken beteiligt sind, habe ich PLP-GFP-Mäuse benutzt. In diesen Mäusen exprimieren Oligodendrozyten das GFP. Die Astrozyten habe ich mit SR101 angefärbt und dann pro Schnitt einen Astrozyt für 20 min mit Biocytin gefüllt. Die Auswertung der Netzwerke ergab außerhalb der Barreloids, wie im adulten Thalamus, einen Anteil von ca. 50 % Oligodendrozyten ( $51,9 \% \pm 2,9 \%$ , 15 Schnitte von 11 Mäusen). In den Barreloids war der Anteil an Oligodendrozyten sogar noch größer ( $64 \pm 5,0 \%$ , 7 Schnitte von 7 Mäusen;  $P = 0,03$ ). Die Anzahl der gekoppelten Zellen war außerhalb der Barreloids etwas höher ( $155,8 \pm 18,1$  Zellen, 15 Schnitte von 11 Mäusen) als in Barreloids ( $96,6 \pm 10,1$  Zellen, 7 Schnitte von 7 Mäusen;  $P = 0,005$ ). Bei diesen Experimenten ist aufgefallen, dass innerhalb des Raumes, in dem ein Netzwerk lag, auch Oligodendrozyten lagen, die nicht Teil des Netzwerkes waren. Auszählungen ergaben, dass 26 % ( $26,4 \pm 4,8$  Zellen von  $90 \pm 15,7$  Zellen) der PLP-positiven Zellen innerhalb des Netzwerkvolumens Biocytin-negativ, also nicht Teil dieses Netzwerkes waren. Zusammengefasst bestehen gliale Netzwerke in Barreloids der juvenilen Maus

aus Astrozyten und Oligodendrozyten, aber es gibt auch Oligodendrozyten, die scheinbar isoliert liegen.

Als Nächstes beschäftigte ich mich mit der Zellzusammensetzung der Barreloids selbst. Bisher war nur bekannt, dass die Zelldichte entlang der Barreloidgrenzen größer ist als in den Barreloids (Van der Loos, 1976). Wie die verschiedenen Zelltypen dort verteilt sind und ob bestimmte Zelltypen diese Grenzen bilden, war unbekannt. Deshalb habe ich jeweils Färbungen der verschiedenen Zelltypen mit der Hoechst-Kernfärbung, die die Grenzen gut visualisiert, kombiniert. Für die Auswertung wurde dann die Fluoreszenzintensität mittels Zeilenabtastungen senkrecht zu den Barreloidgrenzen gemessen. Ich konnte zeigen, dass die GFP-positive Oligodendrozyten die Zellen sind, die die Grenzen bilden. Um die Verteilung von Neuronen und ihren Fortsätzen zu untersuchen, habe ich Schnitte mit dem neuronalen Marker NeuN und dem axonalen Marker SMI gefärbt. Die neuronalen Somata zeigten eine gleichmäßige Verteilung, während die Axone vor allem in den Barreloids verliefen. Um nur die Fortsätze der Neuronen in einem Barreloid darzustellen und deren bevorzugte Richtung zu bestimmen, füllte ich einige Neuronen mittels Einzelzellektroporation mit dem Farbstoff Alexa 594 (5 Schnitte). Der Median-Winkel zwischen den neuronalen Fortsätzen und dem Barreloid war  $6^\circ$  ( $2^\circ$ - $39^\circ$ , 5 Schnitte von 5 Mäusen). Die neuronalen Fortsätze verliefen also ungefähr parallel zu der Längsachse der Barreloids.

Bisher ergaben die Experimente, dass die Barreloidgrenzen einen Effekt auf die glialen Netzwerke haben und dass vor allem Oligodendrozyten diese Grenzen bilden. Das führte zu der Frage, ob diese Oligodendrozyten Teil der glialen Netzwerke in den Barreloids waren. Dafür wurden in PLP-GFP-Mäusen Kopplungsexperimente durchgeführt, bei denen Oligodendrozyten, die auf Barreloidgrenzen lagen, mit Biocytin (20 min) gefüllt wurden. 2 von 8 Biocytin-gefüllten Oligodendrozyten (2 Schnitte von 2 Mäusen) waren komplett ungekoppelt. Die anderen 6 Zellen (6 Schnitte von 6 Mäusen) zeigten signifikant kleinere Netzwerke ( $39,8 \pm 4,8$  Zellen, davon 51,5 % Oligodendrozyten und 48,5 % Astrozyten) als die bisher untersuchten Schnitte (Füllung von Oligodendrozyten außerhalb von Barreloids ( $86,7 \pm 13,9$  Zellen, davon  $66,5 \pm 8,4$  % Oligodendrozyten (Griemsmann et al., 2015)) oder Netzwerke in Barreloids nach



Astrozytenfüllung ( $96,6 \pm 10,1$  Zellen, siehe oben)). Wie bei den ersten Experimenten (Füllung von Astrozyten) zeigten sich auch hier viele PLP-GFP-positive Zellen, die innerhalb des Netzwerkraumes lagen ( $39\%$ ,  $13,3 \pm 2,2$  von  $33,7 \pm 3,8$  Zellen), aber nicht Biocytin-gefüllt waren.

Die letzten Experimente der Arbeit zielten auf die Frage, ob neuronale Aktivität einen Einfluss auf die Ausbildung der glialen Netzwerke hat. Um herauszufinden, ob die gliale Kopplung in den Barreloids durch neuronale Aktivität kontrolliert wird, haben wir Versuche in Wildtyp-Mäusen (C57/Bl6J) durchgeführt. Die Schnitte wurden für 3 bis 4 h mit TTX ( $0,5 \mu\text{M}$ ) und  $\omega$ -Conotoxin GVIA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) präinkubiert, um die neuronale Aktivität zu blocken. Außerdem wurde eine SR101-Färbung gemacht, um die Astrozyten anzufärben. Danach wurde pro Schnitt jeweils ein Astrozyt in einem Barreloid für 20 min mit einer Lösung gefüllt, die TRD, Biocytin und das fluoreszierende Glukoseanalogon 2-NBDG enthielt. Im Kontrollexperiment wurden die Schnitte statt mit TTX und  $\omega$ -Conotoxin GVIA für die gleiche Zeit mit ACSF inkubiert. 2-NBDG hat sich in den Kontrollexperimenten in  $50,3 \pm 1,7$  Zellen ausgebreitet (5 Schnitte von 4 Mäusen). Bei Blockierung der neuronalen Aktivität war die Kopplung signifikant reduziert auf  $26,6 \pm 10$  Zellen (5 Schnitte von 4 Mäusen). Die Hemmung der neuronalen Aktivität führte auch zu einem Verlust der ovalen Netzwerkform in Barreloids ( $y/x$ -Verhältnis mit TTX und  $\omega$ -Conotoxin GVIA  $0,96 \pm 0,02$ ). Nach Fixierung der Schnitte haben wir auch noch die Biocytinausbreitung untersucht. Auch hier war die Anzahl der gekoppelten Zellen bei neuronaler Hemmung ( $54,1 \pm 3,5$  Zellen, 5 Schnitte von 4 Mäusen) im Vergleich mit der Kontrolle ( $88,2 \pm 4,6$  Zellen, 5 Schnitte von 4 Mäusen) signifikant reduziert.

Da die ersten Experimenten gezeigt hatten, dass innerhalb der panglialen Netzwerke Oligodendrozyten lagen, die nicht Teil dieses Netzwerkes waren, wollten wir untersuchen, ob es auch isoliert liegende Astrozyten gibt. Dafür wurden in Schnitten von PLP-GFP-Mäusen Astrozyten mit SR101 angefärbt. Dann wurde pro Schnitt ein Astrozyt für 20 min mit 2-NBDG gefüllt und die Fluoreszenz mit Zwei-Photonen-Mikroskopie online analysiert. Die starke Fluoreszenzintensität der Patchpipette, die einen Teil des Schnittes überdeckte, erschwerte eine verlässliche komplette Auszählung der Zellen des gesamten Netzwerkes. Trotzdem waren eindeutig viele Astrozyten SR101-positiv und 2-NBDG-negativ ( $40\%$  der SR101-positiven Astrozyten innerhalb des Netzwerkbereichs),

also nicht Teil des gefüllten Netzwerkes. Dieser Anteil war auch nach Präinkubation mit TTX gleich. Folglich gibt es neben Oligodendrozyten auch Astrozyten, die im Bereich eines gefüllten glialen Netzwerkes liegen, aber nicht Teil davon sind.

## 1.5 Diskussion

Es ist zunehmend anerkannt, dass Astrozyten eine heterogene Zellpopulation mit verschiedenen Eigenschaften darstellen. Dadurch können sie die jeweiligen Bedürfnisse der einzelnen Hirnregionen erfüllen (Matyash and Kettenmann, 2010). Über Gliazellen des Thalamus ist im Vergleich zu anderen Regionen des ZNS sehr wenig bekannt. Aktuelle Forschungen haben allerdings gezeigt, dass die molekularen und funktionellen Eigenschaften der Gliazellen im Thalamus signifikant von denen im Kortex oder Hippokampus abweichen (Griemsmann et al., 2015; Höft et al., 2014). In der vorliegenden Studie haben wir Gliazellen in den Barreloids des somatosensorischen Thalamus untersucht. Diese Barreloids sind Zellgruppen, die sensorischen Input von den einzelnen Tasthaaren der Maus erhalten und diese Signale zu den korrespondierenden Barrels im Neokortex weitergeben (Land et al., 1995). Wir zeigen hier, dass GJ-Netzwerke im Thalamus aus Astrozyten und Oligodendrozyten bestehen. Die Netzwerkgröße ist durch die Barreloidgrenzen limitiert und die Netzwerkform wird dadurch oval. Die Barreloidgrenzen bestehen aus weniger stark gekoppelten Oligodendrozyten. Neuronale Aktivität beeinflusst ebenfalls die Größe und Form der glialen Netzwerke.

Es wurde bereits in anderen Hirnregionen gezeigt, dass die Form und Größe astrozytärer Netzwerke abhängig von neuronalen funktionellen Einheiten sein kann. Bei den Barrels im somatosensorischen Kortex (Houades et al., 2008), im olfaktorischen Bulbus (Roux et al., 2011) oder entlang der dendritischen Bäume von Purkinjezellen im Kleinhirn (Müller et al., 1996) wurde dieser Zusammenhang bereits belegt. Nachdem ich eine geeignete Schnittebene durch den VPM definiert hatten, konnten ich die Barreloidgrenzen in akuten Hirnschnitten ohne Anfärbung visualisieren und untersuchen. Die Experimente zeigen, dass im juvenilen ventrobasalen Thalamus die Barreloidgrenzen als Kopplungsgrenzen fungieren. Im Gegensatz zu den glialen Netzwerken in kortikalen Barrels oder im olfaktorischen Bulbus bestehen die Netzwerke in den Barreloids nicht nur aus Astrozyten. Wie im adulten Thalamus (Griemsmann et

al., 2015) bestehen die Netzwerke zu ungefähr gleichen Anteilen aus Astrozyten und Oligodendrozyten.

Ältere Arbeiten beschreiben sogenannte septale Regionen mit verminderter Dichte neuronaler Somata innerhalb der Barreloidgrenzen (Land et al., 1995; Van der Loos, 1976). Die von mir durchgeführten Immunfärbungen zeigten in der gewählten Schnittebene keine septalen Regionen.

Durch die Experimente mit PLP-GFP-Mäusen konnten wir zeigen, dass die Barreloidgrenzen durch Oligodendrozyten gebildet werden, die vergleichsweise schwach gekoppelt sind. Das könnte erklären, warum die Biocytin-gefüllten Netzwerke sich nur innerhalb eines Barreloids ausbildeten.

Wir beobachteten, dass viele PLP-GFP-positive Zellen und auch einige Astrozyten, die innerhalb des untersuchten Netzwerkes lagen, Biocytin-negativ, also nicht Teil des Netzwerkes waren. Solche ungekoppelten Astrozyten wurden auch im juvenilen Hippokampus beschrieben (Houades et al., 2006). Während dies im Hippokampus durch das unreife funktionelle Stadium der Zellen in jungen Mäusen erklärt werden konnte (Schools et al., 2006; Strohschein, 2011; Wallraff et al., 2004), ist diese Erklärung für den Thalamus unwahrscheinlich. Im Thalamus der Maus erreicht die Zellkopplung nämlich bereits mit einem Alter von zwei Wochen einen stabilen Zustand (Griemsmann et al., 2015). Obwohl noch nicht klar ist, ob die Biocytin-negativen Zellen wirklich ungekoppelt waren, oder Teil eines anderen Netzwerkes, liefern unsere Daten weitere Evidenz für funktionelle Heterogenität zwischen thalamischen Gliazellen.

Astrozyten im ventrobasalen Thalamus unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Expression von AMPA/KA-Glutamatrezeptoren voneinander (Höft et al., 2014) und andere Studien zeigten Unterschiede bezüglich ihrer Antwort auf die Stimulation von sensorischen und kortikothalamischen Afferenzen (Parri et al., 2010; Pirrtimaki and Parri, 2012). Es muss noch gezeigt werden, ob die Astrozyten verschiedene Funktionen haben und in verschiedener Art und Weise mit den Neuronen in den Barreloids kommunizieren.

Es wurde bereits gezeigt, dass neuronale Aktivität einen Einfluss auf gliale Netzwerke haben kann. Zum Beispiel wurde verstärkte Kopplung zwischen Astrozyten in Kokulturen mit Neuronen (Fischer und Kettenmann, 1985; Rouach et al., 2000) oder durch Stimulation des optischen Nervs (Marrero und Orkand, 1996) beobachtet. Die

veränderte Phosphorylation von Cx43 wurde als ein Mediator dieses aktivitätsabhängigen Effektes beschrieben (Giaume et al., 2010). Arbeiten im Hippokampus, wo gliale Kopplung vor allem über Cx43 (Griemsmann et al., 2015) stattfindet, zeigten, dass neuronale Aktivität nur die Ausbreitung von Energiemetaboliten wie 2-NBDG veränderte, während die Biocytin-Ausbreitung unverändert blieb (Rouach et al., 2008). Im olfaktorischen Bulbus hingegen verminderte die Hemmung neuronaler Aktivität die Ausbreitung von Biocytin in astroglialen Netzwerken (Roux et al., 2011). Durch die Verwendung von Cx-Knockout-Mäusen und die Berücksichtigung des verspäteten Beginnes der Cx30-Expression, vermuteten Roux et al., dass in olfaktorischen Glomeruli Cx30 das Molekül ist, das die aktivitätsabhängige astrogliale Kopplung regelt. Wir zeigen in unserer Studie, dass die Hemmung neuronaler Aktivität die Ausbreitung von 2-NBDG und Biocytin in glialen Netzwerken in Barreloids in gleichem Maße signifikant vermindert. Unsere Daten sind daher passend zu den Ergebnissen von Roux et al. (2011). Auch im Thalamus ist Cx30 das vorherrschende Cx, das für die gliale Kopplung notwendig ist (Griemsmann et al., 2015). Basierend auf den Ergebnissen von Griemsmann et al. (2015) und der aktivitätsabhängigen Kopplung, die wir in der vorliegenden Studie zeigen konnten, gehen wir davon aus, dass die pangliale Kopplung in den Barreloids des juvenilen Thalamus vor allem über heterotope Cx30:Cx32-Kanäle stattfindet.

Eine wichtige Frage ist, welcher Mechanismus die neuronale Aktivität und die GJ-Kopplung verlinkt. Bisher wurde angenommen, dass Änderungen des extrazellulären  $K^+$  die Cx30-GJ Kir-Kanal-abhängig steuern könnten (Roux et al., 2011).

Astrozyten können über ihre Endfüßchen, die die Kapillaren bedecken, Glukose aus dem Blut aufnehmen (Belanger et al., 2011). Durch die Ausbildung von GJ-Netzwerken sind sie entscheidend verantwortlich für die Energieversorgung von Neuronen, um synaptische Aktivität zu ermöglichen (Rouach et al., 2008). Aber welche Rolle spielen die thalamischen Oligodendrozyten, die 60 % der gekoppelten Zellen in Barreloids ausmachen? Vorherige 2-NBDG-Experimente unserer Gruppe, bei denen Astrozyten gefüllt wurden, zeigten, dass sich das Glukoseanalogon in die Oligodendrozyten und entlang der Myelinscheiden um Axone ausbreitete. Da Oligodendrozyten metabolisch stark aktive Zellen sind (Amaral et al., 2016), führen unsere Ergebnisse zu der Annahme, dass die Kopplung zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten wichtig für die

metabolische Versorgung der myelinisierten Axone sein könnte (Fünfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012; Morrison et al., 2013). Dabei könnte das gliale Netzwerk als eine Art Speicher dienen, um Moleküle zum Beispiel für die Fettsynthese in Oligodendrozyten und die Myelinisierung bereitzuhalten.

Eine weitere wichtige Frage ist, welche funktionelle Bedeutung die Trennung der glialen Netzwerke zwischen den einzelnen Barreloids hat. Im Fall der neokortikalen Barrels wurde angenommen, dass die Separation der astrozytären Netzwerke benötigt wird, um den somatotopen Tasthaar-Signalweg weiter einzugrenzen (Houades et al., 2008). Dieses Konzept könnte auch in den Barreloids gelten. Die Vermutung ist, dass gliale Netzwerke, die größere Gruppen von Neuronen versorgen würden, dazu führen könnten, dass Informationen unspezifisch unter diesen verteilt würden. Es ist wenig bekannt über die Fähigkeit glialer thalamischer Netzwerke, neuronales Verhalten wahrzunehmen und zu modulieren. Trotzdem kann man spekulieren, dass die Isolation der glialen Netzwerke die relevanten Glia-Neuron-Interaktionen auf das Barreloid selbst limitiert. Diese Separierung könnte auch helfen, generalisierte abnorme neuronale Aktivität zu verhindern. Außerdem könnte man sich vorstellen, dass die auf einzelne Barreloids begrenzten Netzwerke zu einer gezielten Energieversorgung führen, bei der benötigte Metaboliten nur zu dem jeweils aktiven Barreloid des Tasthaar-Signalweges gelangen. Deprivations-Experimente haben schon gezeigt, dass solch ein Signalweg-spezifischer neuronaler Metabolismus existiert (Land and Akhtar, 1987). Zukünftige Studien müssen die spezifische Rolle der verschiedenen gekoppelten Gliazelltypen bezüglich ihres Einflusses auf synaptische und axonale Aktivität in Barreloids im Thalamus genauer untersuchen.

## **1.6 Zusammenfassung**

Der Nucleus ventralis posteromedialis des Thalamus spielt eine wichtige Rolle in der somatosensorischen Informationsverarbeitung. Bei Mäusen enthält er längliche Zellansammlungen, die Barreloids genannt werden. Diese repräsentieren jeweils ein Tasthaar der Maus und projizieren auf einen zugehörigen Barrel im Kortex.

Neben Neuronen spielen Astrozyten und andere Gliazellen eine wichtige Rolle für die Funktion des Gehirns. In den letzten Jahren wurde bekannt, dass Astrozyten, die untereinander große Netzwerke ausbilden können, weit mehr Funktionen als erwartet

haben und eine sehr heterogene Gruppe darstellen. Bisher wurden gliale Netzwerke in Barreloids nicht untersucht.

Ich habe eine Methode entwickelt, um diese Barreloids in akuten Hirnschnitten darzustellen. Mittels Elektrophysiologie, Immunhistochemie und Elektroporation in transgenen Mäusen mit zelltypspezifischer Fluoreszenz konnte ich die erste Struktur-Funktions-Analyse glialer Netzwerke in Barreloids durchführen. Ich konnte zeigen, dass die Netzwerke aus gekoppelten Gliazellen neben Astrozyten auch Oligodendrozyten enthalten. Die Ausbreitung von Biocytin und einem fluoreszierenden Glukosederivat in diesen Netzwerken war abhängig von neuronaler Aktivität und begrenzt durch die Barreloidgrenzen. Diese Grenzen wurden vor allem durch schwächer bis gar nicht gekoppelte Oligodendrozyten gebildet. Neuronale Somata waren gleichmäßig über die Barreloidfelder verteilt, während ihre Fortsätze vor allem in den Barreloids und parallel zu den Grenzen verliefen. Viele Astrozyten und Oligodendrozyten, die räumlich in einem glialen Netzwerk lagen, waren trotzdem nicht Teil dieses Netzwerkes.

Wir gehen davon aus, dass Oligodendrozyten die Zellen darstellen, die die Ausbildung von kommunizierenden panglialen Netzwerken auf ein Barreloid begrenzen. Dieses Prinzip könnte wichtig sein, um die angemessene metabolische Versorgung von aktiven Neuronen in einem Tasthaar-Signalweg sicherzustellen.

## 1.7 Literaturverzeichnis

Amaral AI, Hadera MG, Tavares JM, Kotter MR, Sonnewald U. Characterization of glucose-related metabolic pathways in differentiated rat oligodendrocyte lineage cells. *Glia* 2016; 64:21-34

Anders S, Minge D, Griemsmann S, Herde MK, Steinhäuser C, Henneberger C. Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369

Bedner P, Steinhäuser C, Theis M. Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818:1971-1984

Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 2011; 14:724-738

Fischer G, Kettenmann H. Cultured astrocytes form a syncytium after maturation. *Exp Cell Res* 1985; 159:273-279

Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Mobius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 2012; 485:517-521

Fuss B, Mallon B, Phan T, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Nishiyama A, Macklin WB. Purification and analysis of *in vivo*-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev Biol* 2000; 218:259-274

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11:87-99

Griemsmann S, Höft SP, Bedner P, Zhang J, von SE, Beinhauer A, Degen J, Dublin P, Cope DW, Richter N, Crunelli V, Jabs R, Willecke K, Theis M, Seifert G, Kettenmann H, Steinhäuser C. Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb Cortex* 2015; 25:3420-3433

Haidarliu S and Ahissar E. Size gradients of barreloids in the rat thalamus. *J. Comp Neurol.* 2001; 429, 372-387

Haydon PG and Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev.* 2006; 86, 1009-1031

Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 2010; 463, 232-236

Höft S, Griemsmann S, Seifert G, Steinhäuser C. Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369

Houades V, Kirchhoff F, Ezan P, Rouach N, Koulakoff A, Giaume C. Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biology* 2006; 2:3-14

Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 2008; 28:5207-5217

Jones EG (ed.). *The thalamus*. Second edition. New York: Cambridge University Press, 2007

Land PW, Akhtar ND. Chronic sensory deprivation affects cytochrome oxidase staining and glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in adult rat ventrobasal thalamus. *Brain Res* 1987; 425:178-181



Land PW, Buffer SA, Jr., Yaskosky JD. Barreloids in adult rat thalamus: three-dimensional architecture and relationship to somatosensory cortical barrels. *J Comp Neurol* 1995; 355:573-588

Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 2012; 487:443-448

Marrero H, Orkand RK. Nerve impulses increase glial intercellular permeability. *Glia* 1996; 16:285-289

Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Hüttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 2003; 23:1750-1758

Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 2010; 63:2-10

Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends Cell Biol* 2013; 23:644-651

Mosconi T, Woolsey TA, Jacquin MF. Passive vs. active touch-induced activity in the developing whisker pathway. *Eur J Neurosci* 2010; 32:1354-1363

Müller T, Möller T, Neuhaus J, Kettenmann H. Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia* 1996; 17:274-284

Nagy JI, Lynn BD, Tress O, Willecke K, Rash JE. Connexin26 expression in brain parenchymal cells demonstrated by targeted connexin ablation in transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.* 2011; 34:263-271

Nevian T, Helmchen F. Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation. *Pflugers Arch* 2007; 454:675-688

Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 2001; 33:72-86

Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Sensory and cortical activation of distinct glial cell subtypes in the somatosensory thalamus of young rats. *Eur J Neurosci* 2010; 32:29-40

Pirttimaki TM, Parri HR. Glutamatergic input-output properties of thalamic astrocytes. *Neuroscience* 2012; 205:18-28

Rouach N, Glowinski J, Giaume C. Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 2000; 149:1513-1526

Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 2008; 322:1551-1555

Roux L, Benchenane K, Rothstein JD, Bonvento G, Giaume C. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:18442-18446

Schools GP, Zhou M, Kimelberg HK. Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *J Neurophysiol* 2006; 96:1383-1392

Sugitani M, Yano J, Sugai T, Ooyama H. Somatotopic organization and columnar structure of vibrissae representation in the rat ventrobasal complex. *Exp Brain Res* 1990; 81:346-352

Strohschein S. 2011. Einfluss des Aquaporin 4 Kanals auf die Kaliumpufferung und die Gap junction Kopplung im Hippocampus der Maus. Dissertation, University of Bonn, *urn:nbn:de:hbz:5n-30700*

Theis M, Giaume C. 2012. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res* 2012; 1487:88-98

Van Der LH. Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett* 1976; 2:1-6

Volterra A and Steinhäuser C. Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Glia* 2004; 47: 249-257

Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhäuser C. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 2004; 48:36-43

Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 1979; 171:11-28

## **2. Publikation**



*Cerebral Cortex*, 2016; 1–10

doi: 10.1093/cercor/bhw368  
Original Article

ORIGINAL ARTICLE

# Barreloid Borders and Neuronal Activity Shape Panglial Gap Junction-Coupled Networks in the Mouse Thalamus

Lena Claus<sup>1</sup>, Camille Philippot<sup>1</sup>, Stephanie Griemsmann<sup>1,5</sup>,  
Aline Timmermann<sup>1</sup>, Ronald Jabs<sup>1</sup>, Christian Henneberger<sup>1,2,3</sup>,  
Helmut Kettenmann<sup>4</sup> and Christian Steinhäuser<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cellular Neurosciences, Medical Faculty, University of Bonn, Sigmund Freud Strasse 25, D-53105 Bonn, Germany, <sup>2</sup>German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Sigmund-Freud-Str. 27, 53127 Bonn, Germany, <sup>3</sup>Institute of Neurology, University College London, Queen Square, London WC1N 3BG, UK, <sup>4</sup>Cellular Neuroscience, Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, 13092 Berlin, Germany and <sup>5</sup>Current address: Institute of Neuro- and Sensory Physiology, University of Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

Address correspondence to Christian Steinhäuser, Institute of Cellular Neurosciences, Medical Faculty, University of Bonn, Sigmund Freud Strasse 25, D-53105 Bonn, Germany. Email: christian.steinhaeuser@ukb.uni-bonn.de

## Abstract

The ventral posterior nucleus of the thalamus plays an important role in somatosensory information processing. It contains elongated cellular domains called barreloids, which are the structural basis for the somatotopic organization of vibrissae representation. So far, the organization of glial networks in these barreloid structures and its modulation by neuronal activity has not been studied. We have developed a method to visualize thalamic barreloid fields in acute slices. Combining electrophysiology, immunohistochemistry, and electroporation in transgenic mice with cell type-specific fluorescence labeling, we provide the first structure-function analyses of barreloidal glial gap junction networks. We observed coupled networks, which comprised both astrocytes and oligodendrocytes. The spread of tracers or a fluorescent glucose derivative through these networks was dependent on neuronal activity and limited by the barreloid borders, which were formed by uncoupled or weakly coupled oligodendrocytes. Neuronal somata were distributed homogeneously across barreloid fields with their processes running in parallel to the barreloid borders. Many astrocytes and oligodendrocytes were not part of the panglial networks. Thus, oligodendrocytes are the cellular elements limiting the communicating panglial network to a single barreloid, which might be important to ensure proper metabolic support to active neurons located within a particular vibrissae signaling pathway.

**Key words:** astrocyte, barreloid, gap junction coupling, oligodendrocyte, thalamus

## Introduction

The thalamus plays an important role in relay and modulation of information to the neocortex. The ventral posterior medial nucleus (VPM) of the ventrobasal thalamus is part of

the somatosensory system. It contains an array of elongated cellular domains called barreloids, which provide a structural basis for the somatotopic organization of vibrissae representation (Van Der 1976; Land et al. 1995). As part

of the whisker pathway, barreloids receive sensory input from individual vibrissae and transmit their output to the corresponding cortical barrels (Sugitani et al. 1990; Mosconi et al. 2010).

It is increasingly appreciated that astrocytes represent a morphologically and functionally heterogeneous cell population, which form extended gap junction-coupled networks (Theis and Giaume 2012). Gap junction channels are composed of connexins (Cx) and the different isoforms are expressed in a cell type-specific manner (Bedner et al. 2012). Functional coupling among astrocytes is mainly based on Cx43 (gene name, *Gja1*) and Cx30 (*Gjb6*) while gap junctions between oligodendrocytes are formed by Cx47 (*Gjc2*) and Cx32 (*Gjb1*). Recent studies have shown that astrocytes in the thalamus differ in various aspects from their counterparts in other brain regions. For instance, thalamic astrocytes are heterogeneous in expressing AMPA-type glutamate receptors (Höft et al. 2014), and extensive panglial coupling between astrocytes and oligodendrocytes is a prominent pathway of inter-glial communication in the thalamus but less so in the hippocampus or neocortex (Griemsmann et al. 2015). Astrocytic gap junction networks in the hippocampus are critical for the delivery of energetic metabolites to maintain synaptic activity (Rouach et al. 2008). Conversely, neuronal activity may regulate the permeability of astrocytic gap junction channels, as has been shown in the olfactory bulb (Roux et al. 2011). Moreover, previous work demonstrated that the shape of astrocyte coupling networks may be restricted to and oriented along neuronal compartments. Such confined networks are found in the barrel fields of the neocortex, where intercellular astroglial coupling preferentially occurs within the barrels, while coupling across the borders of these columns is virtually absent (Houades et al. 2008).

Compared with barrel fields in the neocortex, much less is known about the cellular composition and properties of thalamic barreloids. Notably, not a single study, so far has addressed the functional properties of glial cells and their impact on neuronal signaling in these domains; the standard work “The thalamus” (Jones, 2007) even lacks the key words glia, astrocyte, or oligodendrocyte in the index. In this study, we developed a method to visualize thalamic barreloids in acute brain slices, which allowed for structure-function analyses. Our findings reveal abundant intercellular communication between astrocytes and oligodendrocytes, but at the same time also demonstrate functional heterogeneity among barreloidal glial cells, indicating that they might have distinct roles in controlling neural microcircuits.

## Materials and Methods

Experiments were performed with tissue from transgenic mice with astrocyte- (human glial fibrillary acidic protein-enhanced green fluorescence (hGFAP-EGFP); Nolte et al. 2001) or oligodendrocyte-specific fluorescence labeling (myelin proteolipid protein-green fluorescence protein (PLP-GFP); Fuss et al. 2000) and from wild-type mice (C57/Bl6j/N, Charles River) of either sex, aged between postnatal days (p) 14–17. Mice were kept under standard housing conditions. All experiments were carried out in accordance with local, state, and European regulations.

## Electrophysiology

Mice were anaesthetized with isoflurane (Abbott) and decapitated. Brains were removed and cut in 200  $\mu$ m thick slices using a vibratome (VT1200S, Leica) filled with ice-cold preparation solution (1.25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 87 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM glucose, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 75 mM

sucrose) bubbled with carbogen (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) at pH 7.4. The cutting plane was optimized to allow visualization of the barreloids in acute slices (see Results). The slices were transferred to carbogenized preparation solution (35°C, 20 min) and stored in carbogenized artificial cerebrospinal fluid (ACSF; 1.25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma Aldrich), 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM glucose, 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) at room temperature (RT; pH 7.4). Slices were then transferred to a recording chamber and continuously perfused with carbogenized ACSF. Barreloids and cells were visualized using a microscope (Axioskop, Zeiss) equipped with a CCD camera (PCO) using 10 $\times$  (Zeiss) and 60 $\times$  (Olympus) objectives. Pipettes were fabricated from borosilicate glass capillaries with an outer diameter of 2 mm (Hilgenberg) and had resistances of 3–5 M $\Omega$  when filled with the internal solution (130 mM K-gluconate, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM  $\text{Na}_2\text{-ATP}$ , 20 mM 10 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES), 10 mM ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA)), pH 7.2, supplemented with 0.5% N-biotinyl-1-lysine (biocytin, Sigma Aldrich) and 0.1% Texas Red Dextran (3 kDa, Invitrogen). For glucose diffusion experiments, the internal solution (105 mM K-gluconate, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM  $\text{Na}_2\text{-ATP}$ , 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, 30 mM KCl, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4, 285 mOsm) contained the glucose analog 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose (2-NBDG, Molecular Probes, Life Technologies) (2 mg/mL) supplemented with 0.5% biocytin and 0.1% Texas Red Dextran. The tracer biocytin (372 Da) permeates gap junctions while Texas Red Dextran (3 kDa) is impermeable and hence was confined to the initially filled cell. Currents were recorded at RT using an EPC-800 or EPC-9 patch clamp amplifier (Heka) and monitored by TIDA software (Heka). Thalamic neurons fired spontaneous action potentials as revealed with current clamp recordings (initial resting potential  $-63.5 \pm 2.7$  mV, 5 cells, corrected for a liquid junction potential of  $-7$  mV; not shown). In slices from hGFAP-EGFP mice, astrocytes were identified according to their bright green fluorescence and their morphology (Matthias et al. 2003). These cells displayed electrophysiological properties typical of astrocytes (series resistance ( $R_s$ ) =  $7.6 \pm 0.1$  M $\Omega$ ; membrane resistance ( $R_M$ ) =  $2.1 \pm 0.1$  M $\Omega$ , resting potential  $-77 \pm 1.4$  mV; 38 cells). To identify astrocytes in thalamic slices from PLP-GFP mice, the tissue was incubated in ACSF supplemented with sulforhodamine 101 (SR101; 1  $\mu$ M, 35°C, 20 min; Molecular Probes) (Griemsmann et al. 2015). For gap junction coupling analysis, astrocytes were filled with internal solution for 20 min in the voltage clamp mode. The holding potential was  $-80$  mV and currents were recorded every 10 min. To study the modulation of coupling by neuronal activity, slices were incubated with tetrodotoxin (TTX) (Abcam, ab120055) and  $\omega$ -conotoxin GVIA (Sigma Aldrich) prior to (for 3–4 h) and during the recording. After recording, we fixed the slices in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 (4°C, overnight), and stored them in PBS. If not stated, otherwise, chemicals were purchased from AppliChem.

## Visualization of Tracer Coupling

For visualization of biocytin and barreloid structures, after recording slices were washed (3 $\times$  in PBS) and incubated with blocking solution (10% normal goat serum (NGS), Merck Millipore, and 2% Triton X-100 in PBS; 2 h, RT). Then they were incubated with streptavidin-Cy5 (1:200; Dianova; S32357) or streptavidin-Alexa Fluor 647 (1:600; Molecular Probes, 016-170-084) in PBS with NGS (2%) and Triton X-100 (0.1%) at 4°C, overnight. The next day, slices were washed in PBS and stained with Hoechst (Invitrogen) (1:100 in  $\text{dH}_2\text{O}$ , 10 min, RT). After washing

they were mounted using Aquapolymount (Polysciences Europe). Slices from PLP-GFP mice were blocked for 4 h (10% NGS, 5% Triton X-100, in PBS) and stained for GFP using chicken anti-GFP (Abcam, ab13970) (1:500, 4°C, overnight) and goat anti-chicken Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11039) (1:500, 2% NGS, 0.1% Triton X-100, in PBS, 2 h, RT).

### Single-Cell Electroporation

Single-cell electroporation experiments (Nevian and Helmchen 2007) were performed using a TCS SP5 microscope (Leica). Slices were perfused with ACSF at RT. Pipettes fabricated as described above were filled with 1 mM Alexa Fluor 594 in dH<sub>2</sub>O. Neurons were visually identified within barreloids and filled with Alexa Fluor 594. For that, a pipette was positioned close to the membrane (distance ~1 μm) and a single voltage pulse was applied (-10 to -12 V, 20–30 ms). Thereby a transient pore in the plasma membrane was generated and dye diffused into the soma. Alexa Fluor 594 fluorescence of 8–12 electroporated neurons was analyzed using 2-photon excitation fluorescence imaging. Stacks of optical sections were obtained with a Leica TCS SP5 microscope equipped with an infrared ultra-short-pulse laser (MaiTai; Spectra Physics). Two-photon absorption was achieved by excitation of the fluorophores with femtosecond pulses of infrared light with repetition rates of 80 MHz. The wavelength for excitation was adjusted for best signal to noise ratio for Alexa Fluor 594 and set to 810 nm at approximately 2 W at the output port. Fluorescence was collected with a nondescanned detector. Volumes of 337 × 337 × 80–90 μm<sup>3</sup> (x/y/z) were scanned with a resolution of 1024 × 1024 × 80–90 pixels. Image acquisition recording was performed with Leica LAS AF software and analyzed with Imaris 8.1 (Bitplane AG).

### Cytochrome Oxidase Staining

Mice were anesthetized with isoflurane and decapitated. Brains were removed, fixed in PFA (4% in PBS, pH 7.4, 4°C, overnight) and stored in PBS. Sections (40 μm) were cut as described in Results

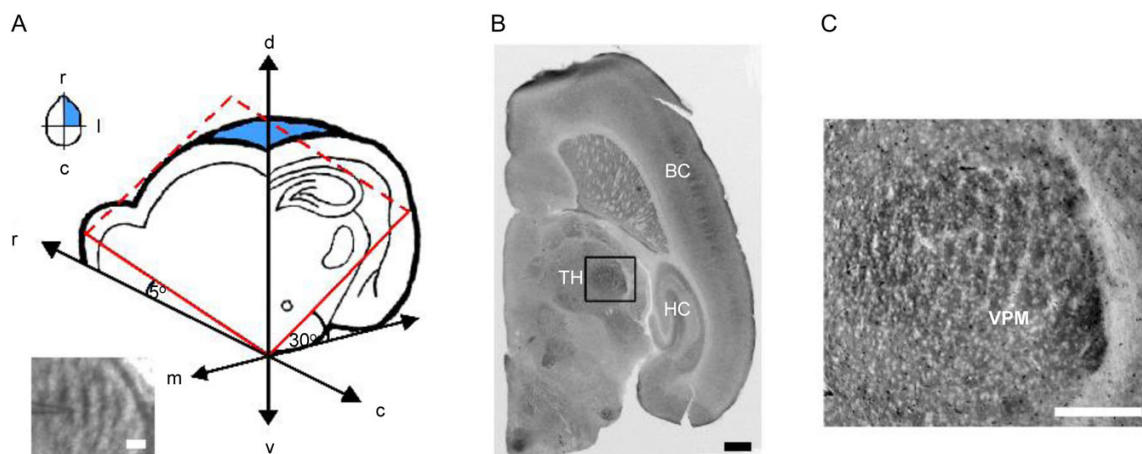
(Fig. 1) using a vibratome (VT1200S) and incubated with a staining medium (0.2 mM DAB, Sigma Aldrich, 100 mL PBS, pH 7.4, 4.03 mM cytochrome C, Sigma Aldrich, 11.4 mM sucrose, 3–6 h, 37°C (Wong-Riley 1979)). After 3 times washing in PBS, they were mounted using a gelatine-glycerol medium (5 g gelatine, Sigma Aldrich, 50 mL distilled water, 50 mL glycerol, Sigma Aldrich, pH 7.0).

### Immunohistochemistry

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 80 mg/kg ketamine hydrochloride (Medistar) and 1.2 mg/kg medetomidine hydrochloride (CP Pharma) and perfused with PBS followed by 4% PFA. Dissected brains were postfixed in 4% PFA in PBS, pH 7.4 at 4°C overnight, and transferred in 30% sucrose in PBS for 2–3 days. Frozen brains were cut (80 μm thick) as described in Results using a vibratome (VT1200S). Slices were washed (3× in PBS) and incubated with blocking solution (10% NGS, 0.4% Triton X-100, in PBS, 2 h, RT). Then they were incubated with the primary and secondary antibody in 0.1% Triton X-100, 2% NGS, in PBS overnight. The following primary antibodies were used: chicken anti-GFP (1:400, Abcam, ab13970), mouse anti-neurofilament SMI312 (1:200, Covance; SMI-312 R), and mouse anti-NeuN (1:200, Chemicon; MAB377). The next day slices were washed (3× in PBS) and incubated with the corresponding secondary antibodies (1.5 h, RT): goat anti-mouse Alexa Fluor 594 (1:500, Invitrogen, A11032), goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 (1:500, Invitrogen, A11037), goat anti-chicken Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, A11039), and goat anti-mouse Alexa Fluor 647 (1:500, Invitrogen, A21235). After washing (3× in PBS), slices were stained with Hoechst (1:100 in dH<sub>2</sub>O, 10 min, RT, Invitrogen), washed and mounted using Aquapolymount (Polysciences).

### Data Analysis

For coupling analyses, x/y/z-stack images (z-spacing 1–2 μm) were obtained with a confocal microscope (TCS SP8 Leica) or a microscope equipped with epifluorescence (Axiophot, Zeiss)



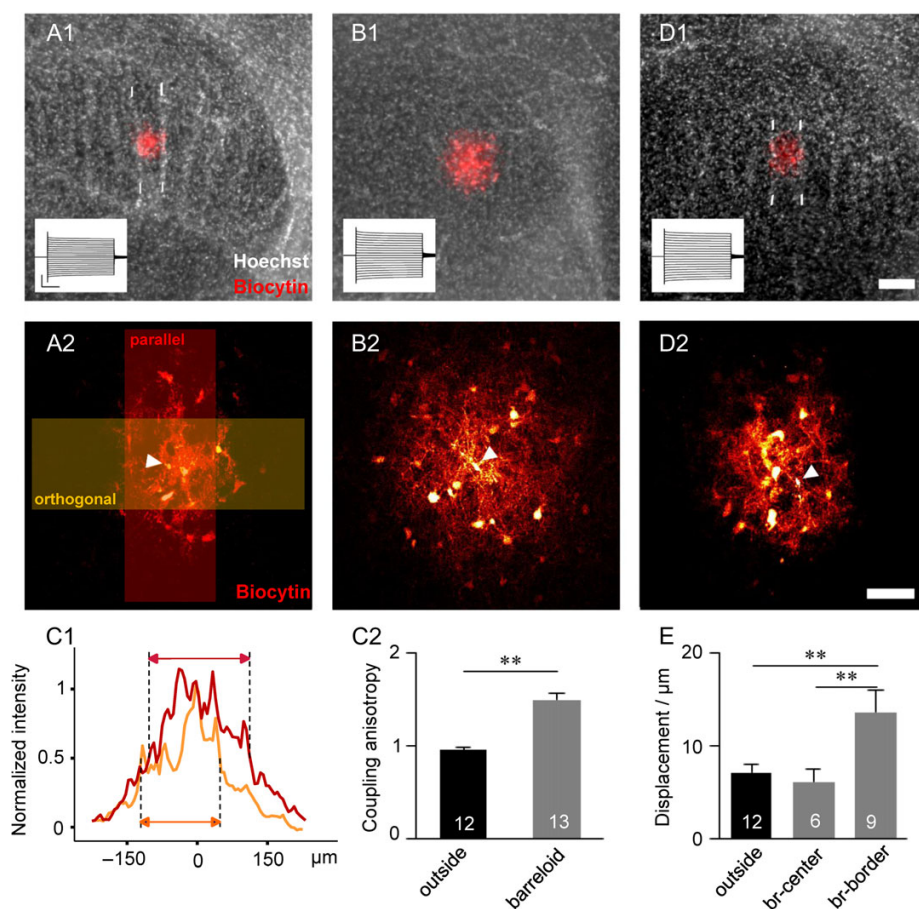
**Figure 1.** An oblique cutting angle visualizes thalamic barreloids in acute brain slices. Visualization of barreloids in acute brain slices of juvenile mice was achieved by modifying the horizontal slice preparation. (A) Scheme of the cutting plane. The inset (top) gives a mouse brain in top view indicating rostral (r), lateral (l), and caudal (c) directions. The blue area is also seen in the larger scheme (d, dorsal; v, ventral; m, medial). The cutting plane (indicated in red) is tilted up 5° anteriorly and 30° laterally from the horizontal plane. This cutting plane allowed visualizing the elongated barreloid fields in acute slices with differential interference contrast optics (inset bottom; barreloid borders appear dark, a patch pipette is seen above tissue, scale bar 100 μm). (B) At p14, cytochrome oxidase staining of fixed slices obtained from hGFAP-EGFP mice visualized barreloids in the thalamus (box; TH, thalamus) and the barrels in the somatosensory cortex (BC, barrel cortex; HC, hippocampus). Scale bar, 500 μm. (C) Higher magnification of the boxed area in (B). The dark, elongated structures represent barreloids, light structures demarcate barreloid borders. Scale bar, 250 μm. VPM, ventral posterior medial nucleus.

employing MetaVue software (Molecular Devices) using 5 $\times$ , 20 $\times$ , and 40 $\times$  objectives (Zeiss). Two different approaches were used for coupling analysis.

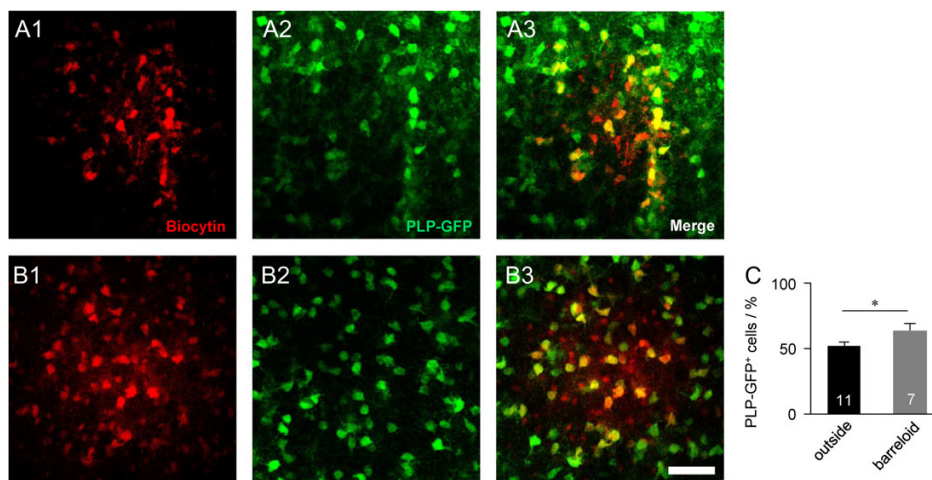
To capture strength and anisotropy of gap junction coupling between cells in hGFAP-EGFP mice (Fig. 2), the number of coupled cells and the shape of the cloud of visualized biocytin were analyzed. To this end, the z-plane containing the cell that was initially filled with biocytin (i.e., the cell with Texas Red fluorescence) was identified. We then counted the biocytin-positive cells in this plane only. The spatial extent of coupling in parallel and orthogonal to barreloid borders was analyzed by obtaining 2 orthogonal fluorescence line profiles through the center of the dye cloud (Fig. 2A2 and C1 for an illustration, length

300  $\mu$ m in 4  $\mu$ m bins, width 100  $\mu$ m), which were normalized to the fluorescence intensity at the patched cell. The width of the fluorescence profile at half maximum was measured. The ratio of widths (parallel over orthogonal) was used as a measure of the anisotropy of coupling. The displacement of the center of the coupled network away from the filled cell was used as an indicator for the presence of a barrier for dye/tracer diffusion (Anders et al. 2014). This was defined by the distance between the calculated network center and the position of the filled cell in the fluorescence profile orthogonal to the barreloid border.

Panglial coupling in PLP-GFP mice (Fig. 3) was quantified by counting the total number of biocytin-filled cells across all z-plane of an image stack. This 3D counting was also used to



**Figure 2.** Barreloid borders restrict dye coupling in thalamic glial networks. Acute brain slices containing barreloids were prepared from hGFAP-EGFP mice (p14–17). One astrocyte per slice was identified by its intrinsic fluorescence, typical morphology, and passive current pattern upon de- and hyperpolarization of the membrane between  $-160$  and  $+20$  mV (10 mV increment, holding potential  $-80$  mV; scale bars, 12.5 ms, 5 nA; insets). During recording, the cell was filled with biocytin (20 min) included in the patch pipette solution. (A) An astrocyte in the center of a barreloid field was filled. The low magnification image (A1) shows a merge of the coupled biocytin-filled network (red) and Hoechst staining (white). The short white lines indicate the barreloid borders. (A2) gives at higher resolution a confocal image (one optical plane) of the same network. The white arrow head indicates the initially filled astrocyte. Note the oval shape of this network. (B) Filling a thalamic astrocyte outside the barreloid fields gave rise to a spherical coupling network, with the initially filled cell (arrow head) being located in its center (B1, B2). (C1) The shape of the coupling networks was assessed by calculating normalized fluorescence profiles along orthogonal lines in parallel (red) and orthogonal (orange) to the barreloid borders (position and size of fluorescence line profiles illustrated in A2). (C2) The ratio of parallel and perpendicular widths of the fluorescence profiles (full width at half maximum) was above one and significantly higher within barreloid fields (gray, 19 slices from 13 mice) than in the spherically shaped thalamic networks outside the fields (black, 19 slices from 12 mice). (D) Filling an astrocyte within a barreloid close to its border (D1, plotted gray lines indicate barreloid borders) resulted in asymmetric diffusion, that is, the initially filled cell (arrow head) was apart from the visualized network center (D2). (E) The distance of the initially filled cell from the calculated coupling network center (see Materials and Methods) was significantly larger when cells close to the barreloid border were filled (br-border, 11 slices from 9 mice) compared with cells filled in the barreloid center (br-center, 8 slices from 6 mice) or outside barreloid fields (black, 19 slices from 12 mice). Scale bars, 100  $\mu$ m (A1, B1, D1) and 50  $\mu$ m (A2, B2, D2). Number of mice is given in bar graphs.



**Figure 3.** Panglial coupled networks in barreloids contain many oligodendrocytes. Astrocytes were identified through SR101 labeling in the thalamus of juvenile PLP-GFP mice. One astrocyte per slice was filled with biocytin and coupling was visualized as described in the legend to Fig. 2. (A) Networks within the barreloid fields (A1) were predominantly composed of GFP-positive oligodendrocytes (A2, A3). Note that many of the GFP-positive cells were located directly at the barreloid borders. (B) Thalamic coupling networks outside the barreloids (B1) also contained many GFP-positive oligodendrocytes (B2, B3), which, however, were more evenly distributed. Scale bar, 50  $\mu$ m. Note that several PLP-GFP-positive cells within the coupled domain lack biocytin. (C) Networks within the barreloid fields (7 slices from 7 mice) contained more PLP-GFP-positive cells than those outside (15 slices from 11 mice). Number of mice is given in bar graphs.

estimate the spread of 2-NBDG in C57Bl/6 and PLP-GFP mice and its dependence on neuronal activity. To this end, intercellular 2-NBDG fluorescence was captured online with 2-photon excitation fluorescence imaging (TCS SP5, Leica) 20 min after loading and analyzed offline with Fiji software.

To analyze the orientation of neuronal processes relative to barreloid borders, image stacks of groups of electroporated neurons were obtained. Imaris 8.2 (Bitplane) was used to generate 3D reconstructions and to compute iso-surfaces. In addition to fluorescence intensity, a criterion for data inclusion was a volume of at least 3000 voxels. Each calculated volume fragment was fitted into an ellipsoid. Since the 3D distribution of angles of spatial ellipsoid orientation did not follow a normal distribution (Shapiro–Wilk test), we used the median of all ellipsoid principal axes as a sum vector to indicate neuronal orientation. The upper and lower borders of the barreloids from corresponding brightfield pictures were considered as vectors and averaged to a sum vector. The angle between the 2 sum vectors, neuronal orientation, and barreloid orientation was determined for each brain slice. The result of this analysis was given as median and range, since the angle distributions (sum vectors of borders vs. ellipsoids) were not normally distributed (Shapiro–Wilk test).

With the exception of neuronal orientation, all results are given as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and  $n$  refers to the number of mice investigated. The number of slices per condition is given in the figure legends or in Results. Data were tested with Student's  $t$ -test or analysis of variance followed by Tukey's test as appropriate. Differences were regarded as significant at \* $P < 0.05$  or \*\* $P < 0.01$ .

## Results

### Visualization of Barreloid Structures in Acute Brain Slices

To visualize barreloid structures of juvenile mice in acute brain slices for coupling analysis, the cutting plane through the VPM

had to be optimized. The barreloids were best visible when tissue blocks were tilted up 30° laterally and 5° anteriorly from the horizontal plane during preparation of acute slices (Fig. 1A). To confirm that the visualized structures in acute slices corresponded to thalamic barreloids, we performed cytochrome oxidase staining on fixed slices, which is known to tinge barrels in the somatosensory cortex as well as barreloids (Fig. 1B,C) (Mosconi et al. 2010). After fixation, barreloid borders were no longer visible with brightfield illumination. Different staining techniques were tested to allow visualization of barreloid borders and biocytin-filled networks within the same slices. We found that Hoechst staining of nuclei was best suited to simultaneously illustrate barreloid borders and coupled networks.

### Barreloid Borders Limit Biocytin Diffusion

Comparative biocytin coupling analyses were performed in the VPM of juvenile hGFAP-EGFP mice, within and outside the barreloid structures by filling individual astrocytes with biocytin for 20 min. Astrocytes were identified based on their intrinsic fluorescence, characteristic morphology, and passive current pattern (Griemsmann et al. 2015). Barreloids in juvenile mice had a width of 50–120  $\mu$ m and a length 700  $\mu$ m. The number of coupled cells in the plane of the initially filled astrocyte was similar within barreloids ( $25.8 \pm 1.7$ , 19 slices from 13 mice) and outside the barreloid field ( $37.0 \pm 5.9$  cells, 19 slices from 12 mice).

Visual inspection of the biocytin-filled networks revealed that networks within barreloids were oval-shaped, whereas networks outside were circular. To determine the shape of the networks, we analyzed fluorescence line profiles (cf. Fig. 2A2, C1). The full widths at half-maximal intensity were calculated in parallel and orthogonal to barreloid borders and the ratio was taken. By definition, this ratio is 1 for spherical and  $>1$  for elongated networks. Coupling networks within barreloids displayed ratios above unity ( $1.53 \pm 0.08$ ,  $n = 19$  slices from 13 mice). In contrast, coupling networks outside of barreloids had



a significantly lower ratio, close to unity ( $0.95 \pm 0.04$ , 19 slices from 12 mice). Thus, biocytin diffusion between the coupled glial cells within barreloids is anisotropic and occurs preferentially within and along barreloids. This suggests that barreloid borders form a barrier for diffusion between glia cells. We have previously established how an anatomical border can modify dye coupling within a network and established the center of mass displacement as a useful parameter (Anders et al. 2014). In short, if a tracer is injected into a cell close to an anatomical border the tracer will preferentially diffuse away from it such that the center of mass of tracer is different from the site of injection. As illustrated in Fig. 2D, such asymmetric diffusion of the tracer was observed, that is, the visualized network center is no longer located at the initially filled astrocyte, when an astrocyte close to a barreloid border was filled with biocytin. Using a simplified method of quantification (see Materials and Methods), we found that the displacement is significantly higher when cells close to the barreloid border were filled (displacement outside barreloids:  $7.1 \pm 1.0 \mu\text{m}$ , 19 slices from 12 mice; displacement barreloid center:  $6.2 \pm 1.3 \mu\text{m}$ , 8 slices from 6 mice; displacement near barreloid border:  $13.7 \pm 2.3 \mu\text{m}$ , 11 slices from 9 mice, Fig. 2E). Together these data reveal that barreloid borders form a barrier for a coupled glial network thus restricting glial gap junction signaling to an individual barreloid field.

#### Coupling Networks Within Barreloids Comprise Astrocytes and Oligodendrocytes

We have previously reported that coupling networks in the thalamus of adult mice consist of astrocytes and oligodendrocytes while panglial coupling is much less abundant in the hippocampus (Griemsmann et al. 2015). To test whether oligodendrocytes also contribute to the coupling networks within barreloids of juvenile animals, PLP-GFP mice were used. Astrocytes were identified by incubating the tissue with SR101 and then were filled with biocytin during patch clamp recording. Similar to the adult thalamus (Griemsmann et al. 2015), outside the barreloids about half the coupled cells were PLP-GFP-positive ( $51.9 \pm 2.9\%$ , 15 slices from 11 mice), while within these structures the proportion of coupled oligodendrocytes was even higher ( $64.0 \pm 5.0\%$ , 7 slices from 7 mice,  $P = 0.03$ ) (Fig. 3). The number of coupled cells outside the barreloids was higher ( $155.8 \pm 18.1$  cells, 15 slices from 11 mice) than in barreloids ( $96.6 \pm 10.1$  cells, 7 slices from 7 mice,  $P = 0.005$ ). We noted that a fraction of oligodendrocytes located within the tracer-labeled clouds was not filled with biocytin (Fig. 3). Quantification revealed that 29% ( $26.4 \pm 4.8$  out of  $90 \pm 15.7$  cells) of the PLP-GFP-positive cells within the barreloid volumes occupied by the biocytin-labeled networks were not connected to these networks. Thus, juvenile barreloid coupling networks consist of astrocytes and oligodendrocytes, but there are also oligodendrocytes that apparently lack coupling.

#### Barreloid Borders Are Mainly Formed by Weakly Coupled Oligodendrocytes

The density of cell somata in the barreloids is higher at the borders than within the center (Van Der 1976) but it was still unclear how the different cell types are distributed within the barreloids, and which cells form its borders. Using PLP-GFP mice, we noted that oligodendrocytes were preferentially located along the barreloid borders. For quantitative evaluation co-labeling of nuclei and line scanning perpendicularly to the borders were

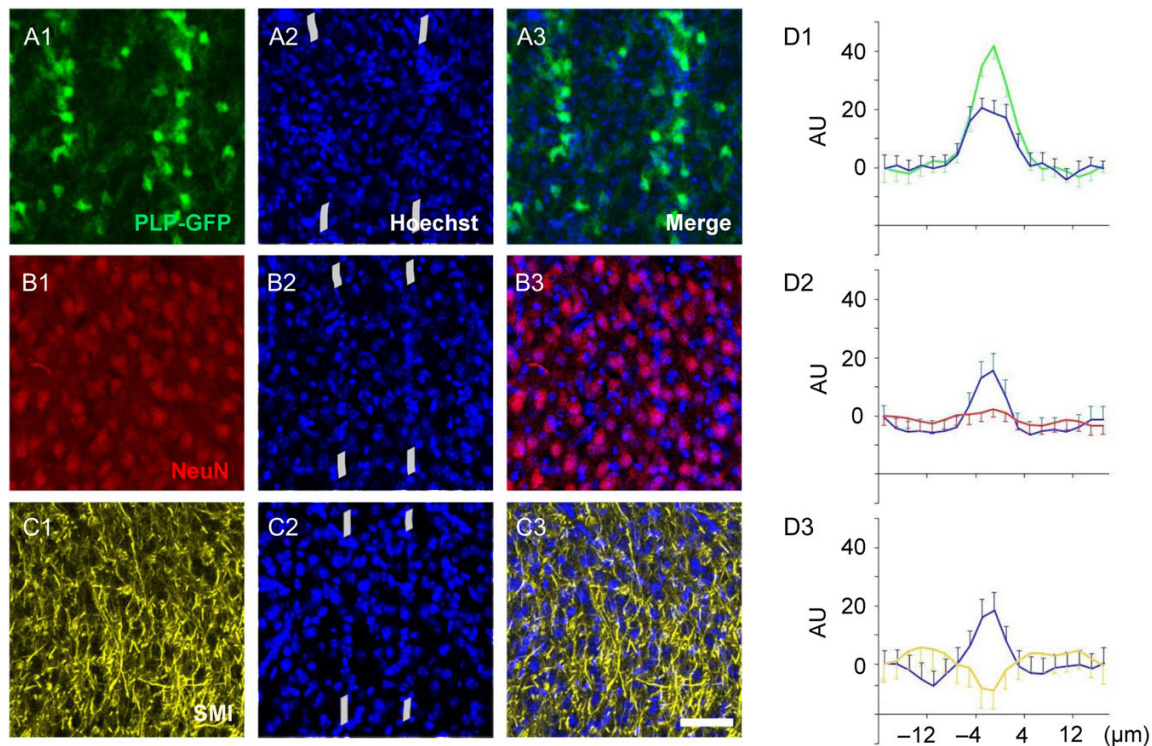
performed, revealing that GFP-positive oligodendrocytes actually formed the border structures (Fig. 4A). To investigate the distribution of neurons and their processes, we stained slices for NeuN (Fig. 4B) and the axonal marker SMI (Fig. 4C), which indicated that neuronal somata were homogeneously distributed while axons run essentially parallel to the barreloid borders. Next we analyzed the complete morphology and orientation of neurons within the barreloids. Therefore, we filled several neurons with the dye Alexa Fluor 594 by electroporation (5 slices). Image stacks of groups of fluorescent neurons were acquired and 3D reconstructions were performed to compute iso-surfaces (Fig. 5A,B). Calculated volume fragments were fitted into ellipsoids, a sum vector was calculated from the 3D orientation of the ellipsoids and after projection into a x-y plane the angle between sum vector and the barreloid borders was determined for each slice. The median of the angle between the neuronal processes and the border of the barreloids amounted to  $6^\circ$  ( $2^\circ$ – $39^\circ$ , 5 slices from 5 mice) (Fig. 5C), similar to the parallel arrangement of axons and barreloid borders observed with SMI staining (Fig. 4C).

The observation that barreloid borders were preferentially formed by oligodendrocytes led us to ask whether those oligodendrocytes were part of the panglial network. Using PLP-GFP mice, oligodendrocytes located on the barreloid border were selected and filled with biocytin during patch clamp recording (20 min). Two of 8 biocytin-filled oligodendrocytes (2 slices from 2 mice) were completely uncoupled (Fig. 6). The remaining 6 cells (6 slices from 6 mice) showed significantly reduced spread of biocytin (to  $39.8 \pm 4.8$  cells, thereof 51.5% oligodendrocytes, and 48.5% astrocytes), as compared with filling oligodendrocytes in extra-barreloid areas (network size  $86.7 \pm 13.9$  cells, thereof  $66.5 \pm 8.4\%$  oligodendrocytes, see Griemsmann et al. 2015), or with intrabarreloid networks after astrocyte filling (cf. above). Again, as observed when filling astrocytes (Fig. 3), many (39%, i.e.,  $13.3 \pm 2.2$  out of  $33.7 \pm 3.8$  cells) of the PLP-GFP-positive cells located within the tracer-filled networks were not biocytin-positive.

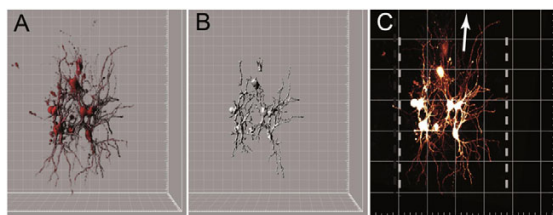
#### Neuronal Activity Shapes Glial Coupling in Thalamic Barreloids

Next we addressed in C57/Bl6/N mice the question whether glial coupling in thalamic barreloids is controlled by neuronal activity (Fig. 7). After preincubation of thalamic slices from wild-type mice with TTX ( $0.5 \mu\text{M}$ ) and  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $0.5 \mu\text{M}$ ) for 3–4 h, individual astrocytes within the barreloid structures were filled (20 min) with a solution containing Texas Red Dextran, biocytin, and the fluorescent metabolizable glucose analog, 2-NBDG. Astrocytes were identified by incubating the tissue with SR101 prior to the recording. Under control conditions, that is, the same preincubation time in ACSF, 2-NBDG spread into  $50.3 \pm 1.7$  neighboring cells (5 slices from 4 mice) while coupling was significantly reduced to  $26.6 \pm 1.0$  cells after inhibition of neuronal activity (5 slices from 4 mice). Neuronal inhibition also entailed spherical network shapes ( $y/x$ -ratio  $0.96 \pm 0.02$ ). After fixation of the tissue slices, we also compared the spread of biocytin. The number of biocytin-labeled cells after inhibition of neuronal activity was also significantly lower ( $54.1 \pm 3.5$  cells; 5 slices from 4 mice) as compared with control slices incubated for the same time in ACSF ( $88.2 \pm 4.6$  cells), and the biocytin-filled networks in TTX-containing solution were also spherical ( $y/x$ -ratio  $0.99 \pm 0.06$ ; 5 slices from 4 mice).

Two-photon online analysis was used to test whether there were also uncoupled astrocytes within the volume spanned by the tracer-filled network. Slices were obtained from PLP-GFP



**Figure 4.** Distinct distribution of oligodendrocytes and neurons within barreloid fields. Slices containing barreloids were prepared from juvenile PLP-GFP mice. (A) The distribution of oligodendrocytes within barreloid fields was revealed by staining for GFP (A1) while Hoechst staining was used to visualize barreloid borders (indicated by short gray lines in A2, B2, C2). The merged image (A3) demonstrates that barreloid borders are mainly composed of oligodendrocytes. (B) NeuN staining indicates that neuronal somata are evenly distributed across barreloid fields. (C) Staining for SMI demonstrates that axons run within the barreloid, mostly in parallel to the field borders. Scale bar 50 μm. (D) To quantitatively assess the distribution of cell types, horizontal line scans (distance 35 μm) across a barreloid border were performed and averaged. The graphs show mean changes in fluorescence intensities as arbitrary units (AU) ± SEM (blue lines, Hoechst; green line, GFP; red line, NeuN; yellow line, SMI), confirming that the borders were mainly formed by oligodendrocytes (D1, 11 slices from 3 mice). Neuronal cell bodies were evenly distributed (D2, 11 slices from 3 mice), and their axons mainly ran within the barreloid fields (D3, 13 slices from 3 mice).



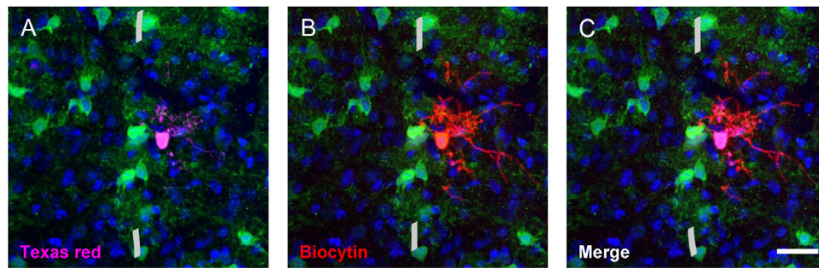
**Figure 5.** Neuronal processes are aligned in parallel to the barreloid axis. (A) Neuronal morphology was assessed by electroporation of somata with Alexa Fluor 594 (red). (B) A 2-photon image stack has been used for 3D reconstruction and was successively overlaid with computed iso-surfaces (white). Individual iso-surfaces were used for an ellipsoid fitting routine. (C) Barreloid borders were labeled (dashed lines) in an aligned maximum intensity projection onto the x-y plane. Principal axes of ellipsoids fitted from (B) were averaged to generate a sum vector (arrow), which was used to determine the angle between barreloid orientation and neuronal processes ( $2^\circ$  in the present example). Scale of the 3D grid units = 20 μm (A, B), 2D grid units = 50 μm (C).

mice, labeled with SR101 and individual astrocytes were filled with 2-NBDG for 20 min. The strong fluorescence intensity of the 2-NBDG-filled patch pipette, which covered part of the region of interest, hampered reliable online analysis of the

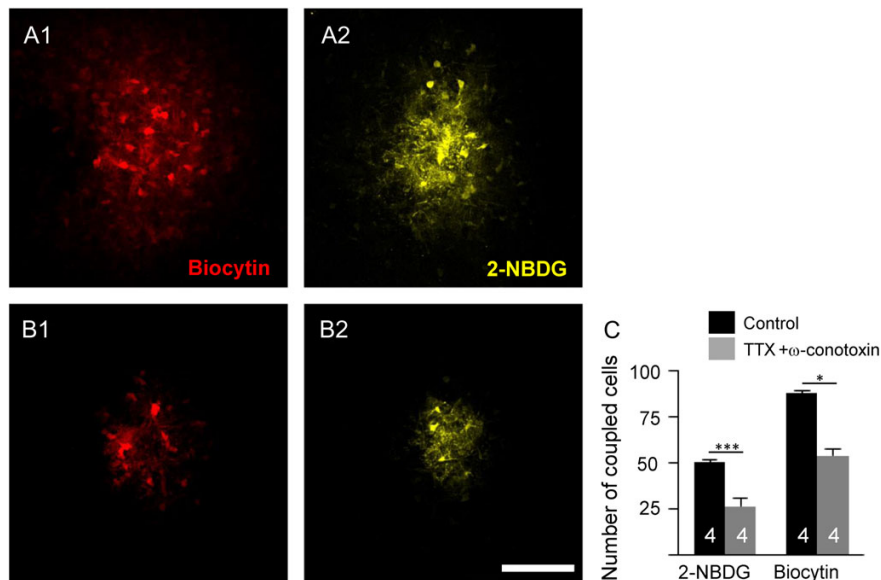
complete coupled network. Nevertheless, there were obviously many uncoupled, that is, 2-NBDG-negative/SR101-positive astrocytes, which apart from the region obscured by the pipette fluorescence amounted to about 40% of the SR101-positive astrocytes within that area, both under normal conditions, and after adding TTX (5 slices from 4 mice). Thus, within the barreloids many astrocytes and oligodendrocytes were not part of the coupling network.

## Discussion

It is now increasingly appreciated that astrocytes comprise a heterogeneous cell population, and possess distinct properties to meet the respective needs of the various brain regions and microcircuits (Matyash and Kettenmann 2010). Compared with other areas of the CNS, little is known about glial cells in the thalamus, but recent studies revealed that their molecular and functional features differ significantly from those in the hippocampus or cortex (Höft et al. 2014; Griemsmann et al. 2015). In this study, we have characterized cells located in the barreloids of the somatosensory thalamus, which represent cell clusters receiving sensory input from individual vibrissae and transmitting their output to the corresponding barrels in the neocortex



**Figure 6.** Uncoupled oligodendrocytes are localized on barreloid borders. Slices containing barreloids were prepared from juvenile PLP-GFP mice. One oligodendrocyte on a barreloid border was identified by its intrinsic fluorescence and filled with Texas Red Dextran and biocytin. (A) The image shows the Hoechst staining (blue), the intrinsic GFP fluorescence (green) and the patched oligodendrocyte (Texas Red Dextran, pink). The gray lines indicate the barreloid border. (B) The biocytin channel (red) of the same cell and the merged picture (C) show that the patched oligodendrocyte is uncoupled. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . The patched cell was initially located directly on the barreloid border. It shifted a few  $\mu\text{m}$  to the right due to technical issue regarding the patch technique. Scale bar, 25  $\mu\text{m}$ .



**Figure 7.** Neuronal activity modulates glial coupling in thalamic barreloids. Slices containing barreloids were prepared from juvenile C57Bl/6 mice. (A) An individual astrocyte within the barreloid was filled with biocytin (red, A1), Texas Red Dextran and the glucose analog, 2-NBDG (yellow, A2) after incubation for 3–4 h in ACSF. (B) Slices were incubated with TTX (0.5  $\mu\text{M}$ ) and  $\omega$ -conotoxin GVIA (0.5  $\mu\text{M}$ ) for 3–4 h and an astrocyte was filled similar as in A. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . (C) Inhibition of neuronal activity decreased the spread of 2-NBDG and biocytin. The data are an average from 5 slices from 4 mice for both, control and TTX+ $\omega$ -conotoxin. Number of mice is given in bar graphs.

(Land et al. 1995). We report here that gap junction networks in the thalamus comprise astrocytes and oligodendrocytes. Network size is limited by barreloid borders, which are mainly formed by weakly coupled oligodendrocytes and neuronal activity affects the network size and shape.

After defining an appropriate cutting angle, we were able to visualize barreloid structures in acute slices prepared from the ventrobasal nucleus of the thalamus. It has been reported previously that the shape and extent of astroglial gap junction networks can be tightly linked to neuronal functional units, for example, in case of the barrels in the somatosensory cortex (Houades et al. 2008), olfactory glomeruli (Roux et al. 2011) or along the plane of the dendritic tree of Purkinje cells in the cerebellum (Müller et al. 1996). We report here that in the juvenile ventrobasal thalamus, the barreloid borders exert

coupling barriers. In contrast to cortical barrels and olfactory glomeruli, but similar to extra-barreloid areas of the adult thalamus (Griemsmann et al. 2015), networks in the barreloids not only consisted of coupled astrocytes but equally of astrocytes and oligodendrocytes. Our immunostainings did not indicate septal regions with decreased density of neuronal somata as it has been reported earlier (Van Der 1976; Land et al. 1995). However, analysis of PLP-GFP mice revealed that the borders between barreloids are mainly formed by oligodendrocytes, which showed comparatively weak coupling, explaining why the tracer-filled networks within barreloids were asymmetrical and did not extend towards neighboring barreloids.

We noted that many PLP-GFP-positive cells and also some astrocytes located within the volume spanned by the tracer-labeled networks were biocytin-negative. Uncoupled astrocytes

have also been observed in the juvenile hippocampus (Houades et al. 2006), which, however, was due to the immature functional stage of these cells (Wallraff et al. 2004; Schools et al. 2006; Strohschein, 2011). In contrast, the presence of uncoupled cells we report here cannot be attributed to the early age because in the thalamus tracer coupling reaches a steady state already by the second postnatal week (Griemsmann et al. 2015). Although it remains to be shown whether these tracer-negative glial cells were really uncoupled or rather part of another network, our data provide further evidence for functional heterogeneity among thalamic glial cells. Astrocytes in the ventrobasal thalamus differ with respect to the expression of AMPA/KA type of glutamate receptors (Höft et al. 2014) and other studies have shown differences in their responsiveness to stimulation of sensory versus corticothalamic afferences (Pari et al. 2010; Pirrtimaki and Pari 2012). It remains to be shown whether coupled or uncoupled astrocytes have distinct functional properties and communicate differently with barreloidal neurons.

It has been shown that neuronal activity may shape astrocyte coupling networks. For example, increased coupling between astrocytes has been observed in co-cultures with neurons (Fischer and Kettenmann 1985; Rouach et al. 2000) or upon stimulation in the optic nerve (Marrero and Orkand 1996) and altered phosphorylation of Cx43 has been proposed as an mediator of this activity-dependent effect (reviewed by Giaume et al. 2010). However, in the hippocampus, a region where coupling critically depends on Cx43 (Griemsmann et al. 2015), neuronal activity regulated the spread of energy metabolites (including 2-NBDG) through the network, but did not alter gap junction channel permeability as revealed by tracer filling (Rouach et al. 2008). As opposed to the situation in the hippocampus, inhibition of neuronal activity in the olfactory bulb did decrease astroglial gap junction permeability (Roux et al. 2011). Utilizing connexin knockout mice and considering the delayed onset of Cx30 expression, the latter study suggested that in olfactory glomeruli, Cx30 is the target of activity-dependence of astrocytic coupling. We show here that suppression of neuronal activity significantly, and to a similar proportion, reduces the spread of biocytin and 2-NBDG between glial cells in thalamic barreloids. Our data are thus in line with the findings by Roux et al. (2011), given the predominating role of Cx30 for coupling in the thalamus (Griemsmann et al. 2015). Based on results of the latter study and the activity-dependence of coupling shown here, we propose that panglial coupling in the barreloids of the juvenile thalamus is mainly mediated by heterotypic Cx30:Cx32 channels.

What might be the mechanistic link between neuronal activity and gap junction coupling in the thalamus? It has been proposed that fluctuations in extracellular  $K^+$  concentration may control Cx30-formed gap junctions in a Kir channel-dependent manner (Roux et al. 2011). Interestingly, 2 functionally distinct subpopulations of thalamic astrocytes have been described, expressing or lacking AMPA receptors and differing in Kir current densities (Höft et al. 2014). It is thus tempting to speculate that some of the AMPA receptor bearing astrocytes belonged to those remaining tracer-negative in the coupling experiments.

Astrocytes are in the strategic position to take up glucose from the blood through their end-feet covering the capillaries (Belanger et al. 2011), and functional gap junctions of astrocytes are critically required for energetic supply to maintain synaptic activity (Rouach et al. 2008). What is the specific role of oligodendrocytes, which made up 60% of coupled cells in barreloids? Our data show that upon filling an astrocyte with 2-NBDG, the

fluorescent glucose spreads into oligodendrocytes, and along myelin sheaths. Given that oligodendrocytes are metabolically highly active cells (Amaral et al. 2016), our findings suggest that astrocyte-oligodendrocyte coupling may be important for metabolic support of myelinated axons (Fünfschilling et al. 2012; Lee et al. 2012; Morrison et al. 2013). Here, coupling might serve as a back-up pathway to fuel the respective metabolic pathways, for example, lipid synthesis in oligodendrocytes and myelination.

What might be the functional significance of isolating barreloidal glial networks from each other? In case of neocortical barrels, it has been proposed that glial network separation is required to narrow down the somatotopic whisker signaling pathway (Houades et al. 2008), a concept that similarly might apply to barreloidal coupling. There, the implicit assumption is that glial networks would otherwise synchronize larger neuronal assemblies or distribute information unspecifically among these. In the thalamic barreloids, little is known about the ability of glial networks to sense and modulate neuronal behavior. It is nonetheless tempting to speculate that isolation of glial networks limits output-relevant glia-neuron interactions to the barreloid itself. Along the same line of thought, spatially restricted glial networks could also help stabilizing somatotopic projection by preventing generalization of aberrant neuronal activity. As a metabolic implication one may envision that the restricted barreloidal networks lead to uncoupling in terms of energy supply, thereby limiting the metabolic load to the respectively active vibrissae signaling pathways. Indeed, deprivation experiments have revealed such a pathway-specificity of neuronal metabolism (Land and Akhtar 1987). Future studies will have to unravel the specific role of the different glial cell types composing panglial networks in maintaining and fine tuning synaptic and axonal activity in barreloids under normal conditions and in the diseased brain.

### Supplementary Material

Supplementary material can be found at: <http://www.cercor.oxfordjournals.org/>

### Author Contributions

L.C., C.P., S.G., R.J., C.H., and C.S. designed the research. L.C., C.P., R.J., C.H., H.K., and C.S. wrote the manuscript. L.C., C.P., R.J., A.T., C.H., and C.S. conducted experiments and analyzed data.

### Funding

German Research Foundation (SPP1757: STE 552/4 to C.S., SFB1089: B03 to C.H., KE 329/28 to H.K., and SPP1757 to C.S., C.H., and H.K.), NRW-Rückkehrerprogramm (to C.H.), and Human Frontiers Science Program (HFSP: RGY-0084/2012, to C.H.).

### Notes

L.C. was a fellow of the BONFOR program of Bonn Medical Faculty. We thank Christian Giaume, Paris for helpful discussions and Dilawar Khan, Bonn for technical support. *Conflict of Interest:* Authors declare no competing financial interests.

### References

Amaral AI, Hadera MG, Tavares JM, Kotter MR, Sonnewald U. 2016. Characterization of glucose-related metabolic pathways in differentiated rat oligodendrocyte lineage cells. *Glia*. 64:21–34.

- Anders S, Minge D, Griemsmann S, Herde MK, Steinhäuser C, Henneberger C. 2014. Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369:20120600.
- Bedner P, Steinhäuser C, Theis M. 2012. Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? *Biochim Biophys Acta.* 1818:1971–1984.
- Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14:724–738.
- Fischer G, Kettenmann H. 1985. Cultured astrocytes form a syncytium after maturation. *Exp Cell Res.* 159:273–279.
- Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Mobius W, et al. 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature.* 485:517–521.
- Fuss B, Mallon B, Phan T, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Nishiyama A, Macklin WB. 2000. Purification and analysis of *in vivo*-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev Biol.* 218:259–274.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci.* 11:87–99.
- Griemsmann S, Höft SP, Bedner P, Zhang J, von SE, Beinhauer A, Degen J, Dublin P, Cope DW, Richter N, et al. 2015. Characterization of panglial gap junction networks in the thalamus, neocortex, and hippocampus reveals a unique population of glial cells. *Cereb Cortex.* 25:3420–3433.
- Höft S, Griemsmann S, Seifert G, Steinhäuser C. 2014. Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369:20130602.
- Houades V, Kirchhoff F, Ezan P, Rouach N, Koulakoff A, Giaume C. 2006. Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biol.* 2:3–14.
- Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C. 2008. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci.* 28:5207–5217.
- Jones EG, editor. 2007. *The thalamus*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press.
- Land PW, Akhtar ND. 1987. Chronic sensory deprivation affects cytochrome oxidase staining and glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in adult rat ventrobasal thalamus. *Brain Res.* 425:178–181.
- Land PW, Buffer SA Jr, Yaskosky JD. 1995. Barreloids in adult rat thalamus: three-dimensional architecture and relationship to somatosensory cortical barrels. *J Comp Neurol.* 355:573–588.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, et al. 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature.* 487:443–448.
- Marrero H, Orkand RK. 1996. Nerve impulses increase glial intercellular permeability. *Glia.* 16:285–289.
- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Hüttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C. 2003. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 23:1750–1758.
- Matyash V, Kettenmann H. 2010. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev.* 63:2–10.
- Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD. 2013. Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends Cell Biol.* 23:644–651.
- Mosconi T, Woolsey TA, Jacquin MF. 2010. Passive vs. active touch-induced activity in the developing whisker pathway. *Eur J Neurosci.* 32:1354–1363.
- Müller T, Möller T, Neuhaus J, Kettenmann H. 1996. Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia.* 17:274–284.
- Nevian T, Helmchen F. 2007. Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation. *Pflugers Arch.* 454:675–688.
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H. 2001. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia.* 33:72–86.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V. 2010. Sensory and cortical activation of distinct glial cell subtypes in the somatosensory thalamus of young rats. *Eur J Neurosci.* 32:29–40.
- Pirttimaki TM, Parri HR. 2012. Glutamatergic input-output properties of thalamic astrocytes. *Neuroscience.* 205:18–28.
- Rouach N, Glowinski J, Giaume C. 2000. Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol.* 149:1513–1526.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science.* 322:1551–1555.
- Roux L, Benchenane K, Rothstein JD, Bonvento G, Giaume C. 2011. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:18442–18446.
- Schools GP, Zhou M, Kimelberg HK. 2006. Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *J Neurophysiol.* 96:1383–1392.
- Sugitani M, Yano J, Sugai T, Ooyama H. 1990. Somatotopic organization and columnar structure of vibrissae representation in the rat ventrobasal complex. *Exp Brain Res.* 81:346–352.
- Strohschein S. 2011. Einfluss des Aquaporin 4 Kanals auf die Kaliumpufferung und die Gap junction Kopplung im Hippocampus der Maus [dissertation]. University of Bonn, urn:nbn:de:hbz:5-n-30700.
- Theis M, Giaume C. 2012. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res.* 1487:88–98.
- Van Der LH. 1976. Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett.* 2:1–6.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhäuser C. 2004. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia.* 48:36–43.
- Wong-Riley M. 1979. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.* 171:11–28.

### **3. Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen. Insbesondere danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die mich kontinuierlich motiviert und unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Steinhäuser danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die Gewährung der ausgezeichneten Möglichkeiten zur Bearbeitung der Fragestellung.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin Stephanie Griemsmann, die mich immer freundschaftlich und mit Fachwissen unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich bei Camille Philippot und Aline Timmermann, die mich in der letzten Phase mit Experimenten unterstützt haben, bedanken.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Zelluläre Neurowissenschaften für die stete Hilfsbereitschaft sowie gute Arbeitsatmosphäre und BONFOR für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsvorhabens.